

**Peptidtemplat-vermittelte Transferreaktionen: Eine chemische Methode für die  
selektive Markierung von Proteinen auf lebenden Zellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

**D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**

(Dr. rer. Nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Ulrike Reinhardt, geb. Laufer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr.-Ing. habil. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Oliver Seitz  
2. Christian P. R. Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Zeit von Februar 2011 bis März 2016 angefertigt.

*Meiner Familie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung.....</b>	<b>3</b>
2.1	Peptidtag-basierte Proteinmarkierungsstrategien.....	3
2.1.1	Enzym-vermittelte Markierungsstrategien.....	3
2.1.2	Metall- und Molekül-vermittelte Markierungsstrategien.....	9
2.1.3	Markierungsstrategien mit Peptid-bindenden Tags.....	16
2.2	Templat-vermittelte Acylreaktionen.....	21
2.2.1	Peptidtemplat-vermittelte Ligation .....	21
2.2.2	Nukleinsäuretemplat-vermittelte Acyltransferreaktionen .....	23
<b>3</b>	<b>Zielstellung .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>29</b>
4.1	Alkyltransferreaktion mit Sulfonatlinkern .....	29
4.1.1	Test des Grundprinzips des Peptidtemplat-vermittelten Alkyltransfers.....	29
4.1.2	Optimierung des Peptidtemplat-vermittelten Alkyltransfers.....	34
4.1.3	Diskussion .....	38
4.2	Acyltransferreaktion von Thioestern auf Cysteinylpeptide.....	39
4.2.1	Test des Grundprinzips des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers .....	39
4.2.2	Optimierung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers .....	47
4.2.3	Anwendung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers auf die Protein- markierung .....	66
4.2.4	Diskussion .....	81

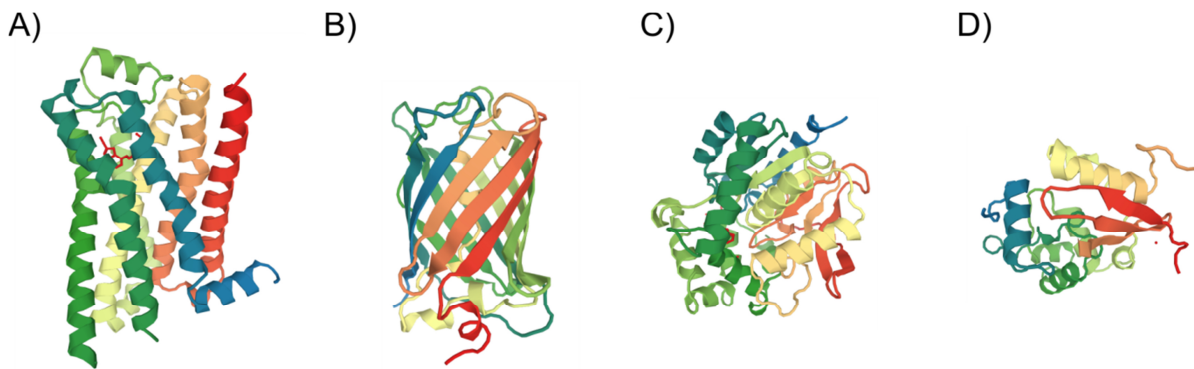


<b>5 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>84</b>
5.1 Zusammenfassung .....	84
5.2 Ausblick .....	91
<b>6 Experimenteller Teil .....</b>	<b>92</b>
6.1 Messgeräte und Hilfsmittel.....	92
6.2 Allgemeine Syntheseprotokolle.....	95
6.3 Versuche zur Alkyltransferreaktion .....	98
6.4 Versuche zur Acyltransferreaktion.....	103
6.5 Versuche zur Proteinmarkierung <i>in vitro</i> .....	113
6.6 Versuche zur Proteinmarkierung <i>in vivo</i> .....	118
<b>7 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>130</b>
9.1 Chromatogramme zu Versuchen aus Kapitel 4.2.2 .....	130
9.2 Chromatogramme und Massenspektren von Peptiden .....	132
9.3 NMR-Spektren von Bausteinen für die Festphasensynthese .....	140
9.4 Lebendzellexperimente.....	143



# 1 Einleitung

Um die Funktion von Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung zu verstehen, ist es unerlässlich ihre Lokalisation und Bewegung im lebenden System sichtbar zu machen. Moderne Techniken zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Proteinen benötigen daher Methoden, die in der Lage sind, das Zielprotein (*protein of interest*, POI) ortsspezifisch mit einer Reportergruppe zu markieren. Dabei sollte der Reporter die Funktionalität und Struktur des Zielproteins möglichst nicht beeinflussen. Vor bereits 20 Jahren revolutionierte die genetische Fusion des POI mit einem autofluoreszierenden Protein wie dem grünfluoreszierenden Protein (green fluorescent protein, GFP) die Bildgebung von Proteinen.[1] Auch heutzutage wird die Proteinmarkierung mittels autofluoreszierender Proteine für eine Vielzahl von Fragestellungen eingesetzt. Die neuere Forschung zielt auf die Verbesserung der Photostabilität und die Erweiterung der Farbpalette der GFP-Familie.[2] Selbst-modifizierende Enzyme wie SNAP-,[3] CLIP-,[4] TMP-[5] und Halo-Tag[6] haben den Umfang an maßgeschneiderten Markierungen signifikant erweitert, da sie die Einführung von Reportern mit einmaligen spektroskopischen Eigenschaften ermöglichten. Dafür wird das Enzym genetisch mit dem POI verbunden und der Ligand synthetisch mit der Reportergruppe verknüpft. Diese Enzym-basierten Tags bieten eine hohe Spezifität und kurze Markierungszeiten, was bei der Untersuchung schneller biologischer Prozesse von großem Vorteil ist. Gleichwohl geht die genetische Fusion mit einem Enzym auch mit einem großen Massenzuwachs einher (Abb. 1). Dies kann den Transport der Proteine oder Protein-Protein-Wechselwirkungen behindern. Um solche Beeinträchtigungen gering zu halten, bemühen sich Forscher aktuell um die Entwicklung kleinerer Tags.



**Abbildung 1:** Größenvergleich zwischen (A) einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR; hier:  $\beta$ 1-Adrenorezeptor, 51 kDa), (B) GFP (27 kDa), (C) Halo-Tag (33 kDa) und (D) SNAP-Tag (20 kDa).

Das kleinstmögliche Tag, welches einem Zielprotein zugefügt werden kann, besteht in dem Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure mittels Amber-Stopp-Codon oder verwandten Technologien.<sup>[7]</sup> Dabei wird der genetische Code so modifiziert, dass ein spezifisches Codon einer artifiziellen Aminosäure zugeteilt wird, welche nachfolgend mittels einer bioorthogonalen Markierungsreaktion adressiert werden kann. Allerdings erfordert der Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Säugerzellen noch immer viel Expertenwissen. Die Ligand-gesteuerte Proteinmarkierung (auch *traceless affinity labeling* genannt) kommt sogar gänzlich ohne Erkennungssequenz aus.<sup>[8]</sup> Ein Ligand des Zielproteins wird dazu mit einer reaktiven Gruppe ausgestattet, die die kovalente Verknüpfung des Reporters mit einer Aminosäureseitenkette an der Oberfläche des Zielproteins bewirkt. Andererseits bedeutet dies, dass die Ligand-gesteuerte Proteinmarkierung nur an Proteinen erfolgen kann, deren native Bindungstasche und Ligandenkoordination wohlbekannt sind.

Die Peptid-basierten Erkennungstags bieten eine attraktive Alternative für die selektive Markierung von Proteinen. Die genetische Kodierung der Peptidsequenzen ist unkompliziert, mit einer Masse von 0.6 – 6 kDa sind sie verhältnismäßig klein und durch chemische Modifizierung können verschiedenste Reportergruppen eingeführt werden. Seit der Entwicklung der ersten Peptidtag-basierten Proteinmarkierungsmethoden in den späten neunziger Jahren ist eine Vielzahl neuer Techniken vorgestellt worden. Auch Chemiker tragen vermehrt zu der Suche nach einer idealen Markierungsstrategie bei.

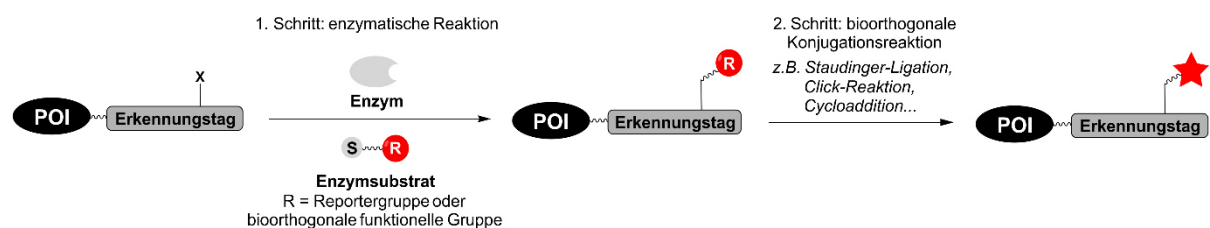
# 2 Stand der Forschung

## 2.1 Peptidtag-basierte Proteinmarkierungsstrategien

Peptidtag-basierte Markierungsmethoden sind vielseitig und können prinzipiell in drei Klassen eingeteilt werden: (1) Enzym-vermittelte Strategien, (2) Metallionen- und Molekül-vermittelte Markierungen und (3) Peptid-vermittelte Markierungsstrategien. Nachfolgend werden die Charakteristika der verschiedenen Ansätze vorgestellt, sowie Anwendungen beleuchtet.

### 2.1.1 Enzym-vermittelte Markierungsstrategien

Chemoenzymatische Markierungsmethoden erlauben den ortsspezifischen Einbau eines Reportermoleküls in Proteine. Zu den verwendeten Enzymen gehören Ligasen, Transferasen und Transpeptidasen. Sie bieten eine natürliche Sequenzspezifität, wobei eine gewisse Substratpromiskuität manchen Enzymen den direkten Einbau artifizieller Reportergruppen ermöglicht. Einige Enzyme sind in der Lage, sequenzspezifisch eine Aminosäureseitenkette zu modifizieren und so eine neue Funktionalität in das Zielprotein einzuführen. Diese kann in einem zweiten Schritt durch eine sehr selektive chemische Reaktion mit dem Reportermolekül verknüpft werden (Abb.2.1). Man spricht dabei auch von einer bioorthogonalen Markierungsreaktion.



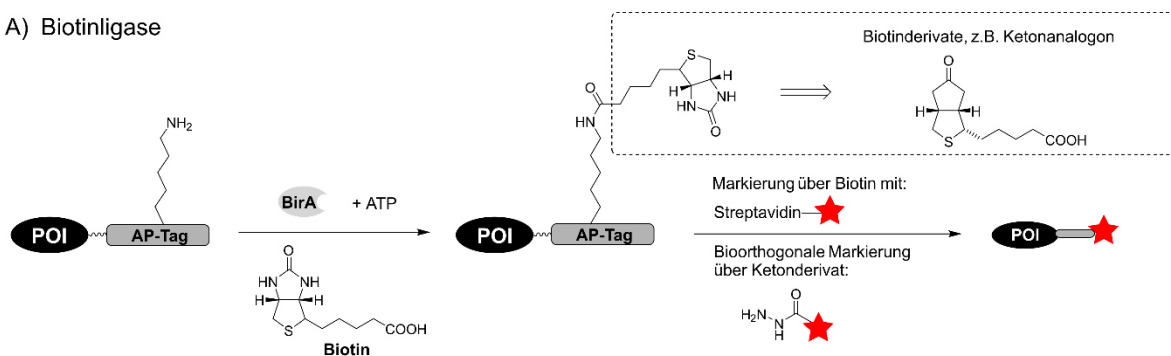
**Abbildung 2.1:** Allgemeines Schema der Peptid-Tag basierten Proteinmarkierung mittels enzymatischen Reaktionen.

Biotinligase (BirA) katalysiert die Anknüpfung einer Biotingruppe an Proteine. Das Enzym erkennt ein 15 Aminosäuren (AS) langes Akzeptorpeptid - AP-Tag genannt (GLNDIFEAQKIEWHE), welches am Lysin modifiziert wird (Abb. 2.2A).<sup>[9]</sup> Die BirA-vermittelte Biotinylierung von Proteinen auf der Oberfläche lebender Zellen wurde für viele verschiedene AP-tragende Proteine demonstriert, wie z. B. den EGF- oder AMPA-Rezeptor.<sup>[10]</sup> BirA wurde auch verwendet, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Die Koexpression von BirA-tragenden und AP-tragenden Proteinen führte nur in Anwesenheit eines Adapterproteins zur erfolgreichen Biotinylierung des AP-Fusionsproteins.<sup>[11]</sup> Auch die Homo- und Heterodimerisierung von Chemokinrezeptoren, die in der Literatur widersprüchlich diskutiert wird, konnte so untersucht werden.<sup>[12]</sup> Neben dem BirA-tragenden CXCR4-Chemokinrezeptor exprimierten die Zellen auch AP-tragende CXCR4-, CCR2- und CCR5-Rezeptoren. Durch die Detektion der Biotinylierung aller Konstrukte konnte gezeigt werden, dass CXCR4 sowohl homo- als auch heterodimerisiert. Die Methode zur Proximitätsuntersuchung von Proteinen konnte auch auf die Untersuchung von synaptischen Rezeptoren, die auf unterschiedlichen Zellen exprimiert werden, angewendet werden.<sup>[13]</sup> Diese Technik wird als BLInC (*biotin labeling of intercellular contacts*) bezeichnet und konnte sogar *in vivo* in *C. elegans* angewendet werden.<sup>[14]</sup> BirA erkennt zudem ein Biotinderivat, welches eine Ketongruppe trägt.<sup>[15]</sup> Nach der enzymatischen Anknüpfung des Ketons wird dieses in einem zweiten Schritt mit einem Fluorophor-tragenden Hydrazid zur Reaktion gebracht. Dafür wird das POI nach der enzymatischen Reaktion über 10 bis 60 min mit 1 mM Hydrazid-funktionalisiertem Reportermolekül behandelt.<sup>[15a]</sup>

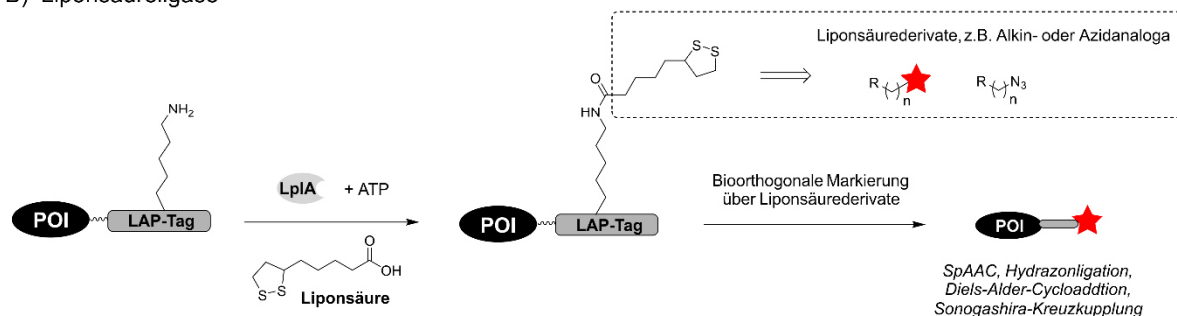
Die *E. coli* Liponsäureligase (LplA) katalysiert die ATP-abhängige Acylierung eines Lysinrestes mit Liponsäure und Liponsäurederivaten (Abb. 2.2B). LplA erkennt spezifisch eine 22 AS lange Sequenz namens LAP1-Tag<sup>[16]</sup>, bzw. das 13 AS lange LAP2-Tag.<sup>[17]</sup> Die Mutation der Liponsäureligase führte zu einem Enzym, das auch fluoreszierende Substrate akzeptiert und so die Proteinmarkierung in nur einem Schritt erlaubt.<sup>[18]</sup> Es war das erste Beispiel für die Umwandlung einer natürlichen Ligase in eine Fluorophor-Ligase. Für die Konjugation mit rot-verschobenen Fluorophoren wurden Azid-tragende Derivate mittels der Enzymmutanten an das POI gebunden, welche in einem Folgeschritt via Click-Reaktion modifiziert wurden.<sup>[18a]</sup> Die LplA-vermittelte Proteinmarkierung wurde auch für die

Anknüpfung von Arylaldehyd- bzw. Hydrazidderivaten der Liponsäure benutzt. Diese konnten mittels Hydrazonligation in einem zweiten Schritt modifiziert werden.<sup>[19]</sup> Die *trans*-Cyclookten- und Norbonenderivate wurden mittels der Diels-Alder-Cycloaddition mit einer Reportergruppe verknüpft.<sup>[20]</sup> Eine *p*-Iodophenylgruppe am Substrat konnte selektiv mit der Palladium-katalysierten Sonogashira-Reaktion adressiert werden.<sup>[21]</sup>

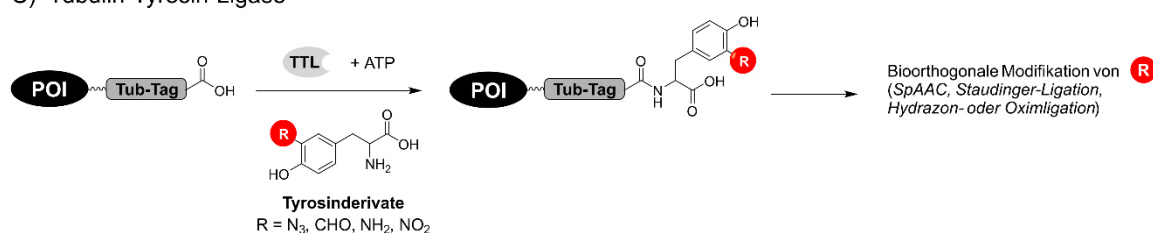
## A) Biotinligase



## B) Liponsäureligase



## C) Tubulin-Tyrosin-Ligase



**Abbildung 2.2:** Proteinmarkierung mittels der Ligasen (A) Biotinligase, (B) Liponsäureligase und (C) Tubulin-Tyrosin-Ligase.

Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) beschleunigt die posttranslationale Anbringung eines Tyrosins an den C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin. Kürzlich wurde eine 14 AS lange, hydrophile Erkennungssequenz, kurz Tub-Tag, für dieses Enzym vorgestellt.<sup>[22]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass TTL auch Tyrosinderivate mit Azid-, Formyl-, Amino- und Nitrylgruppen als Substrat toleriert (Abb. 2.2C). Auf diese Weise wurde mittels eines zweistufigen Protokolls

ein GFP-spezifischer Nanobody mit Biotin, Fluorophoren und PEG-Ketten in Puffer wie auch in Zelllysate markiert.

Phosphopantetheinyltransferasen (PPTase) modifizieren das Peptidcarrierprotein (PCP) und das Acylcarrierprotein (ACP) durch die Anknüpfung der Phosphopantetheinylgruppe vom Coenzym A an die Hydroxylgruppe konservierter Serinseitenketten (Abb. 2.3A).<sup>[23]</sup> Dank der Substratpromiskuität der PPTasen Sfp und AcpS ist es möglich, Coenzym A an seinem N-terminalen Thiol mit kleinen Molekülen auszustatten, z.B. mit Biotin, Zuckern, Peptiden, Porphyrin und Fluorophoren.<sup>[23-24]</sup> Durch die simultane Markierung ACP-tragender Neurokinin-1-Rezeptoren mit Cy3 und Cy5 und FRET-Mikroskopie wurde die laterale Organisation der Rezeptoren in Zellmembranen untersucht.<sup>[25]</sup> Um die Größe der Erkennungssequenz für PPTasen zu reduzieren, wurden kürzere Peptiderkennungssequenzen entwickelt: Das 11 AS lange ybbR-Tag und das 12 AS lange S6-Tag werden bevorzugt durch Sfp erkannt, wohingegen das 12 AS lange A1-Tag durch AcpS modifiziert wird.<sup>[26]</sup> Die Selektivität der Enzyme für die Erkennungssequenzen ist so hoch, dass mit dem S6/A1-Tagpaar die orthogonale Markierung von zwei Proteinen auf der Oberfläche lebender HeLa-Zellen gelang.<sup>[26b, 27]</sup>

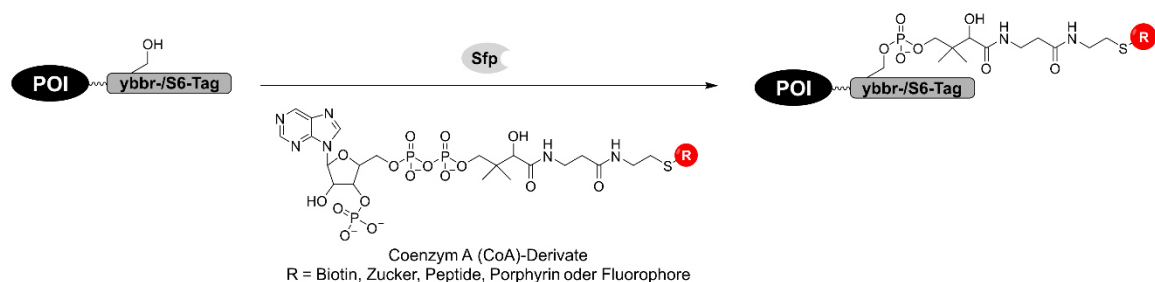
Transglutaminasen (TGasen) sind eine Familie von Enzymen, die die Acyltransferreaktion zwischen Carboxamidgruppen der Glutaminseitenkette und vielen unverzweigten primären Aminen (zumeist  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen) katalysieren. TGasen wurden verwendet, um Proteine *in vitro* zu PEGylieren<sup>[28]</sup> oder um sie zu immobilisieren.<sup>[29]</sup> Die Gruppe von Ting nutzte eine Meerschwein-Transglutaminase (gpTGase), um Proteine auf lebenden Zellen zu markieren. Hierzu wurden Cadaverin-Derivate an ein 6 - 7 AS langes, Glutamin-reiches Q-Tag gebunden (Abb. 2.3B). Die verwendete gpTGase zeichnete sich durch eine hohe Sequenzspezifität und zugleich hohe Substratpromiskuität aus. Mit Hilfe dieses Enzyms konnte auch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B mit einem Photoaffinitätslinker modifiziert werden. Photolyse führte zur Ausbildung einer kovalenten Bindung und ermöglichte die PAGE-Detektion des sonst so schwer zu quantifizierenden NF- $\kappa$ B-Homodimers.<sup>[30]</sup>

Zwei Enzyme für die selektive Anknüpfung und Entfernung einer Reportergruppe wurden von Hedberg *et al.* vorgestellt. Während das Enzym AnkX in der Lage ist, eine

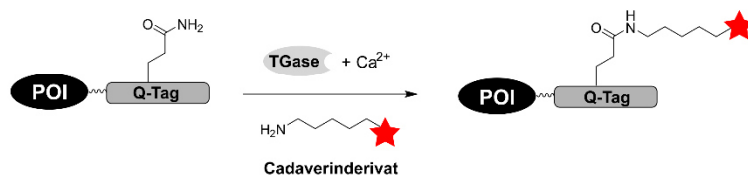


Phosphocholineinheit auf den zweiten Serinrest innerhalb der Sequenz TITSSYYR zu übertragen, kann das Enzym Lem3 die dabei entstehende Phosphodiesterbindung selektiv hydrolysieren (Abb. 2.3C). Die zwei Enzyme stammen aus *Legionella pneumophila* und tolerierten die Fusion des Erkennungstags an den N- oder C-Terminus des Maltosebindenden Proteins als auch die genetische Fusion innerhalb von Schleifenregionen.<sup>[31]</sup>

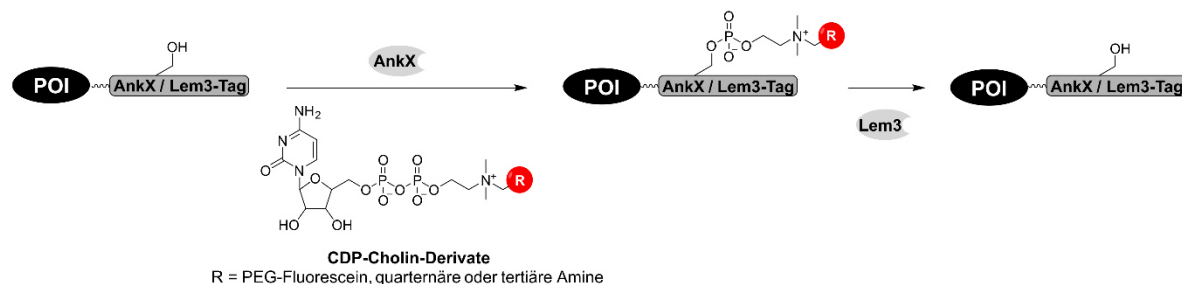
#### A) Phosphopantetheinyltransferase Sfp



#### B) Transglutaminase



#### C) AnkX / Lem3

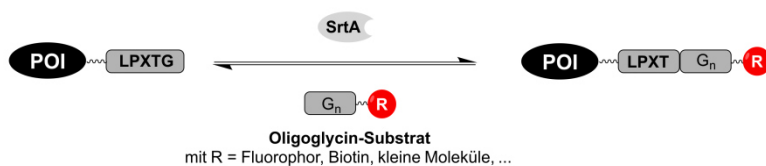


**Abbildung 2.3:** Proteinmarkierung mittels der Transferasen (A) Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) Sfp, (B) Transglutaminase und (C) Phosphocholintransferase AnkX. Die Hydrolase Lem3 ist in der Lage, die Markierung selektiv zu entfernen.

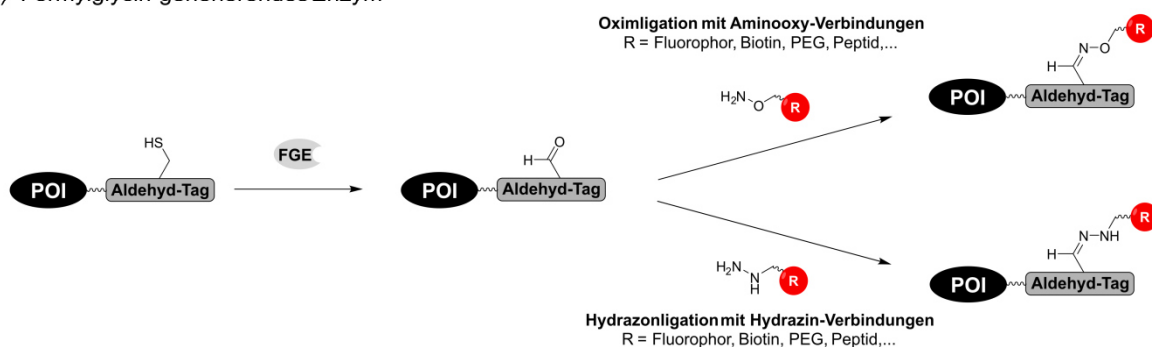
Sortase katalysiert eine Transpeptidasereaktion zwischen einer spezifischen internen Peptidsequenz und der Aminogruppe N-terminaler Glycine. Sortase A (SrtA) erkennt das kurze Pentapeptidmotiv LPXTG. Das Enzym spaltet die Amidbindung zwischen Threonin und Glycin und bildet einen reaktiven Threoninthioester mithilfe eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum des Enzyms. Damit wird die Verknüpfung zwischen dem reaktiven Intermediat und dem N-Terminus eines Pentaglycin-Substrats ermöglicht (Abb. 2.4A).

Diese Markierungsstrategie wird auch als „Sortagging“ bezeichnet. Erste Berichte über SrtA als neues Werkzeug für das Proteinengineering beschreiben die Modifikation von LPETG-tragendem GFP mittels verschiedener Oligoglycin-Substrate, die künstliche Aminosäuren, Proteine oder kleine Moleküle tragen.<sup>[32]</sup> Sortagging kann auf lebenden Zellen durchgeführt werden und dort LPXTG-tragende Rezeptoren fluoreszierend markieren.<sup>[33]</sup> Andere Beispiele für die Proteinmodifizierung mittels Sortagging umfassen die ortsspezifische PEGylierung,<sup>[34]</sup> Lipidierung<sup>[35]</sup> und Glykosylierung<sup>[36]</sup> von Proteinen. Sortase wurde zudem für die Zyklisierung von Peptiden eingesetzt.<sup>[37]</sup> Ein Problem der SrtA-vermittelten Proteinmarkierung ist die Reversibilität der Reaktion. Aus diesem Grund muss zumeist ein Überschuss an Glycinsubstrat eingesetzt werden, um gute Markierungsausbeuten zu erreichen. Der Einsatz eines Depsipeptid-Substrats verhindert die Rückreaktion und führt zu einem fast vollständigen Umsatz.<sup>[38]</sup>

#### A) Sortase A



#### B) Formylglycin-generierendes Enzym



**Abbildung 2.4:** Proteinmarkierung mittels der Enzyme (A) Sortase A (SrtA) und (B) Formylglycin-generierendes Enzym (FGE).

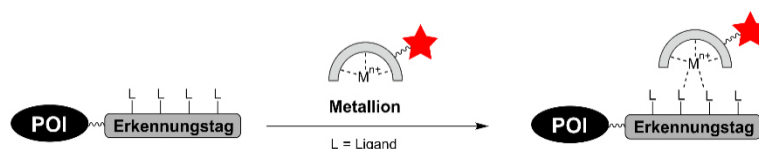
Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) konvertiert das Cystein innerhalb der Erkennungssequenz LCXPXR zu einem Aldehydrest-tragenden Formylglycin (Abb. 2.4B).<sup>[39]</sup> Durch die genetische Fusion mit dem Hexapeptidmotiv und der anschließenden Reaktion mit FGE kann eine Aldehydgruppe ortsspezifisch dem Zielprotein zugefügt werden. Für die Konjugation mit Fluorophoren, Biotin, Peptiden oder PEG-Einheiten kann die

Aldehydgruppe einer Hydrazon- oder Oximligationsreaktionen unterzogen werden.<sup>[39-40]</sup> Da FGE in den meisten Prokaryoten endogen exprimiert wird, erfolgt die Aldehydbildung ohne äußeres Zutun. Es gibt Hinweise, dass Cu(II) dabei als Kofaktor benötigt wird, um hohe Ausbeuten bei der Formyl-generierenden Reaktion zu erhalten.<sup>[41]</sup>

Chemoenzymatische Markierungsmethoden zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und relativ kleine Erkennungssequenzen aus. Als nachteilig stellen sich jedoch die vergleichsweise langen Reaktionszeiten heraus, die zum Erreichen einer vollständigen Markierung benötigt werden. So verläuft die enzymatische Reaktion zwar oft in weniger als einer Stunde für z.B. Biotinligase, Phosphopantetheinyltransferase oder Sortase. Jedoch erfordern die bioorthogonalen Markierungsreaktionen im zweiten Schritt eine Reaktionszeit von bis zu drei Stunden (z.B. Cycloaddition mit gespannten Alkinen oder Staudinger-Ligation) oder erfolgen sogar über Nacht (Cu-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition). Zudem werden für manche Enzyme hohe Substratkonzentrationen benötigt. So wird für die BirA-vermittelte Proteinmarkierung 1 mM Keton-Biotinderivat eingesetzt und für SrtA werden sogar 1-5 mM Oligoglycin-Substrat eingesetzt. Bei der Verwendung so hoher Substratkonzentrationen sind intensive Waschprotokolle von Nöten, um nicht-kovalent gebundene Substrate zu entfernen.

### 2.1.2 Metall- und Molekül-vermittelte Markierungsstrategien

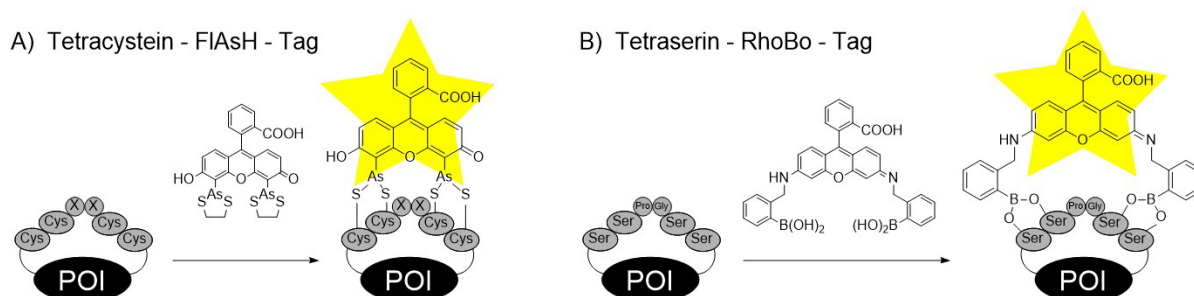
Auch durch die Wechselwirkungen zwischen elektronenarmen Metallionen und elektronenreichen Liganden kann die Selektivität einer Markierungsreaktion sichergestellt werden. Die Bindung der Metallionen – zumeist über Chelateffekte – ermöglicht die Markierung des Zielproteins in nur einem Schritt (Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5:** Allgemeines Schema der Peptid-Tag basierten Proteinmarkierung mittels Metallionen. Im Erkennungs-Tag können verschiedene Aminosäureseitenketten als Ligand für das Metallion fungieren, z.B. Cystein, Histidin, Aspartat, u.v.m.

Die kürzesten Peptidtags stellen das Tetracystein- oder Tetraserinmotiv dar. In einer wegweisenden Studie im Jahr 1998 zeigten Tsien *et al.*, dass Organobisarsenthioester

kovalente Bindungen mit den Thiolseitenketten eines Tetracysteinmotivs CCXXCC – zumeist CCGPCC – eingehen können. Dabei kommt es bei dem *fluorescein arsenical helix binder* (Fluorescein arsenische Helixbinder, FIAsh) bis zu einem 50 000-fachen Anstieg der Fluoreszenz (Abb. 2.6A). Um sowohl die Zytotoxizität als auch unspezifische Bindungen von FIAsh zu reduzieren, werden simultan millimolare Konzentrationen an 1,2-Ethandithiol (EDT) verabreicht.<sup>[42]</sup> Derivate wie ReAsH,<sup>[43]</sup> CHoXAsH,<sup>[43]</sup> CrAsH<sup>[44]</sup> und Cy3As<sup>[45]</sup> konnten das Spektrum verfügbarer Farbstoffe erweitern. In einigen Fällen mussten flankierende Sequenzen zugefügt werden, um die Selektivität zu erhöhen.<sup>[46]</sup> Werden die Reagenzien in 5  $\mu$ M Konzentration zu Zellen gegeben, so sind die Bisarsenfarbstoffe in der Lage die Zellmembran zu durchqueren und intrazelluläre Proteine zu markieren. Zeitaufwendige Waschprozeduren sind erforderlich, um Hintergrundsignale aufgrund der Wechselwirkung mit anderen thiolhaltigen Proteinen zu minimieren. Zudem kann der Einbau der cysteinreichen Erkennungssequenz zu fehlerhaften Disulfidbrücken im Protein und somit zu Fehlfaltungen führen. Die Gruppe von Schepartz präsentierten Bisboronsäuresonden als Alternative zu den Arsensonden. Eine vom Rhodamin abgeleitete Bisboronsäureverbindung (RhoBo) zeigt nanomolare Affinität zu dem Tetraserinmotiv SSPGSS (Abb. 2.6B). Die Bindung an diese Sequenz geht ebenfalls mit einer großen Fluoreszenzintensivierung einher.<sup>[47]</sup> Im Gegensatz zum Tetracysteinmotiv findet man die Sequenz SSPGSS jedoch in mehr als 100 humanen Proteinen, u.a. in der schweren Myosinseitenkette.



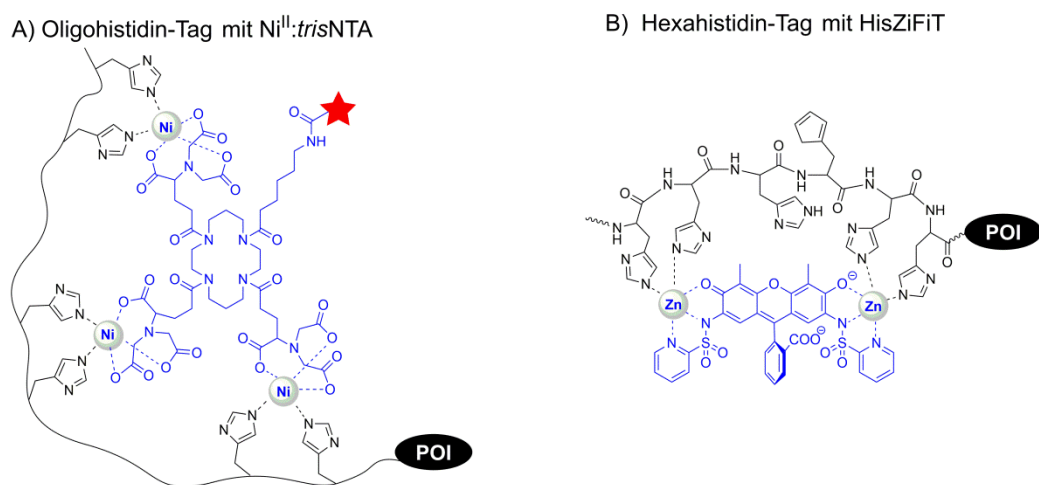
**Abbildung 2.6:** Proteinmarkierung durch die Reaktion zwischen (A) dem Tetracystein-Tag und einer fluorogenen Organobisarsen-Sonde oder (B) dem Tetraserin-Tag und einer Organobisboron-Sonde.

Die Spezifität kann erhöht werden, verwendet man chelatisierende Erkennungstags mit eher unnatürlichen repetitiven Sequenzen, wie z.B. Oligohistidin- oder Oligoaspartattags. Das Hexahistidintag (His<sub>6</sub>-Tag), welches ursprünglich für die Affinitätsreinigung von

Proteinen entwickelt wurde, ist bekannt für die starken Wechselwirkungen mit Übergangsmetallkomplexen, z.B.  $\text{Ni}^{\text{II}}$ :Nitrilotriessigsäure ( $\text{Ni}^{\text{II}}$ :NTA).<sup>[48]</sup> Um die Affinität zwischen Erkennungssequenz und Metallkomplex weiter zu erhöhen, synthetisierten Piehler *et al.* multivalente Komplexe, welche mit zwei bis vier NTA-Einheiten (genannt: *bis*-, *tris*- und *tetrakis*NTA) ausgestattet waren (Abb. 2.7A).<sup>[49]</sup> Dabei zeichneten sich die *tris*NTA-Liganden durch eine außergewöhnlich hohe Affinität zum His-Tag aus ( $\text{Ni}^{\text{II}}$ :*tris*NTA-His<sub>10</sub>:  $K_D = 0.1 \text{ nM}$ ).<sup>[49b]</sup> Die Anbindung heller Fluorophore erlaubte die hochaufgelöste Einzelmolekül-Mikroskopie von Actin- und Laminfilamenten in CHO-Zellen.<sup>[50]</sup> Allbritton entwarf eine trifunktionale Sonde, die aus einer  $\text{Ni}^{\text{II}}$ :NTA-Erkennungseinheit und einer photoreaktiven Arylazidgruppe besteht, mit welcher die kovalente Verknüpfung mit His<sub>6</sub>-markierter muriner Dihydrofolatreduktase (mDHFR) *in vitro* gelang. Die dritte Funktionalität war entweder ein Biotin oder DNA-Strang, für die spätere Modifikation oder Immobilisierung des POI.<sup>[51]</sup> Von Auer *et al.* wurden trifunktionale Sonden, die ein Fluorophor tragen, und ihre Anwendung für die kovalente Markierung des His<sub>6</sub>-tragenden Interleukin-4-Rezeptors auf der Oberfläche lebender Zellen vorgestellt.<sup>[52]</sup> Eine kovalente Modifikation von His<sub>6</sub>-tragenden Proteinen wurde kürzlich von Tørring und Gothelf berichtet. Die sogenannte DNA-Templat-vermittelte Proteinkonjugation nutzt die Bindung eines *tris*NTA-Oligonukleotids an ein His<sub>6</sub>-tragendes POI. Dies erlaubt die ortsspezifische Erkennung durch ein zweites, komplementäres Oligonukleotid mit einer reaktiven *N*-Hydroxysuccinimid-Einheit, welche die anschließende Querverbindung zu einer Lysinseitenkette des POIs ermöglicht.<sup>[53]</sup>

Tsien *et al.* fanden heraus, dass das Hexahistidin-Tag nicht nur  $\text{Ni}^{\text{II}}$ :NTA komplexieren kann, sondern auch  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Sonden ( $\text{HisZiFiT-Zn}^{\text{II}}$ ) mit einem  $K_D \approx 40 \text{ nM}$ .<sup>[54]</sup> Dabei wurde Fluorescein so derivatisiert, dass es als direkter Ligand für zwei  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen agiert (Abb. 2.7B). Das diamagnetische  $\text{Zn}(\text{II})$  löscht die Fluoreszenz nicht (im Gegensatz zum paramagnetischen  $\text{Ni}^{\text{II}}$ ), sodass der Komplex sich durch eine hohe Fluoreszenz auszeichnet. Die Inkubation mit 100 nM HisZiFiT in Puffer plus 1  $\mu\text{M}$  freien  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen und zwei anschließende Waschschrte ermöglichten die Markierung von His<sub>6</sub>-STIM1-CFP auf Zelloberflächen. Hamachi *et al.* stellten einen binuklearen  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :Iminodiessigsäure (*iminodiacetic acid*, IDA) Komplex vor, an welchen ein Cy5-Fluorophor durch eine Amidbindung angebunden war. Zwei His-tragende GPCR (B2R und m1AChR) konnten auf

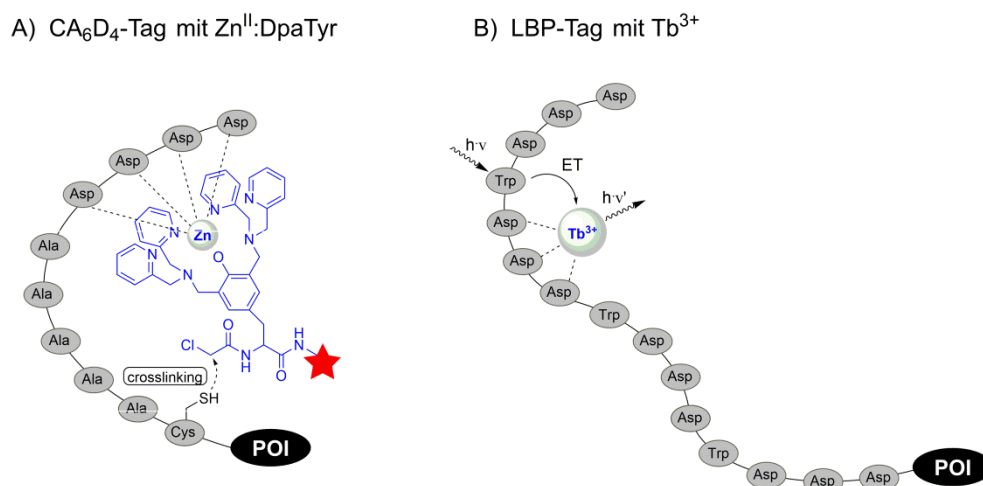
der Oberfläche von HEK293-Zellen selektiv gefärbt werden, indem sie mit  $0.5\ \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{\text{II}}$ :IDA-Cy5-Konjugat über 10 min behandelt wurden.<sup>[55]</sup>



**Abbildung 2.7:** Proteinmarkierung durch Wechselwirkungen zwischen einem Oligohistidin-Tag und (A) einem fluoreszierenden  $\text{Ni}^{\text{II}}$ :trisNTA-Komplex oder (B) dem fluoreszierenden HisZiFiT-Komplex.

Im Jahr 2006 führten Hamachi *et al.* das Oligoaspartat-Tag und die korrespondierenden multinuklearen  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :Bis((dipicolylamino)methyl)thyrosin-Komplexe ( $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr) ein.<sup>[56]</sup> Ein binuklearer  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr zeigte eine moderate Affinität für das D4-Tag ( $K_D = 1.4\ \mu\text{M}$ ). Durch eine Verlängerung des Tags (D4x3-Tag) und Verwendung eines dimeren  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr-Komplexes (mit vier  $\text{Zn}^{\text{II}}$ -Ionen) in  $2\ \mu\text{M}$  Konzentration war jedoch die Fluoreszenzmarkierung des muscarinischen Acetylcholinrezeptors (m1AChR) auf lebenden Zellen möglich. Allerdings sind diese Wechselwirkungen nicht-kovalent und die gebildeten Komplexe dissoziieren während längerer Versuchszeiten. Um diesen ungewollten Markierungsverlust zu vermeiden, wurde dem D4-Tag ein nukleophiler Cysteinrest hinzugefügt und der binukleare  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr-Komplex mit einer  $\alpha$ -Chloroacetylgruppe ausgestattet (Abb. 2.8A). Innerhalb von 12 h Inkubation mit  $20\ \mu\text{M}$  reaktivem  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr-TAMRA-Konjugat drangen die Sonden in *E. coli*-Zellen ein und markierten kovalent intrazelluläres, CA<sub>6</sub>D<sub>6</sub>-tragendes Maltose-bindendes Protein (MBP).<sup>[57]</sup> Es wurde berichtet, dass das D4/  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr-System orthogonal zu dem His<sub>6</sub>/ $\text{Ni}^{\text{II}}$ :NTA-Komplex sei.<sup>[56]</sup> Später erschienen Studien, die eine bemerkenswert hohe Affinität des  $\text{Ni}^{\text{II}}$ :DpaTyr-Komplexes zum FLAG-Tag (DYKDDDDK), D3-Tag (DDD) und D3x2-Tag (DDDXXDDD) beschreiben– mit Affinitäten, die ungefähr 100-fach stärker sind als für das D4/  $\text{Zn}^{\text{II}}$ :DpaTyr-Paar.<sup>[58]</sup> Im Jahr 2012 entwickelten Komatsu *et al.* ein  $\text{Tb}^{3+}$ -bindendes Peptid (LBP), das Asparginsäuren als

Liganden für  $Tb^{3+}$  und Tryptophan als Sensibilisierungsfarbstoff enthält (Abb. 2.8B). Die 15-mer-Sequenz DDDWDDDDWDDDDWDDD wurde genetisch an den C-Terminus von GST fusioniert und sowohl zu Affinitätsreinigung via einer  $Tb^{3+}$ -beladenen Säule als auch zur Fluoreszenzdetektion des Fusionsproteins in Gelen benutzt.<sup>[59]</sup> Diese doppelte Funktionalität zeichnet das LBP als besonders nützliches Tag aus.



**Abbildung 2.8:** Proteinmarkierung durch Wechselwirkungen mit Oligoaspartat-Tags: (A) zwischen dem CA<sub>6</sub>D<sub>4</sub>-Tag und einem fluoreszierenden Zn<sup>II</sup>:DpaTyr-Komplex und (B) zwischen dem LBP-Tag und Tb<sup>3+</sup> (ET = Energietransfer).

Durch den Einsatz von Lanthanidionen können weitere Funktionen wie langlebige Lumineszenz in der Gegenwart von Sensibilisierungsfarbstoffen, exzellente Röntgenstreuung und magnetische Eigenschaften für NMR-Studien eingeführt werden.<sup>[60]</sup> Dies regte die Suche nach Peptidtags mit hohen Affinitäten zu Lanthanidionen an. Die Gruppe von Imperiali optimierte durch eine *split-and-pool*-Strategie eine Sequenz aus der Schleifenregion der Calmodulin-Proteinfamilie und identifizierte so ein 18 AS langes Lanthanid-bindendes Tag (LBT, ACADYNKDGWYEELECAA).<sup>[61]</sup> Mit einem K<sub>D</sub>-Wert von ungefähr 220 nM für die Bindung von Tb<sup>3+</sup> konnte die Erkennungssequenz zur Konzentrationsbestimmung in Zelllysats und zur In-Gel-Visualisierung des LBT-Ubiquitin-Fusionsproteins eingesetzt werden. Später fanden Imperiali *et al.* auch cysteinfreie LBTs mit nanomolaren Affinitäten zu Tb<sup>3+</sup> (YIDTNNDGWYEGDELLA, K<sub>D</sub> = 57 nM<sup>[62]</sup>; FIDTNNDGWIEGDELLLEEG, K<sub>D</sub> = 19 nM<sup>[63]</sup>).

Neben Metall-chelatisierenden Peptiden wurde auch nach Peptidsequenzen gesucht, die direkt kleine fluoreszierende Moleküle binden können. Bereits im Jahr 1998 entdeckten

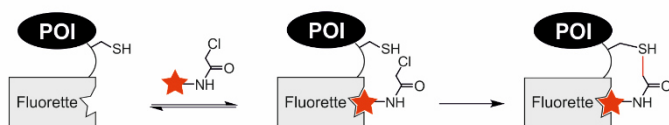
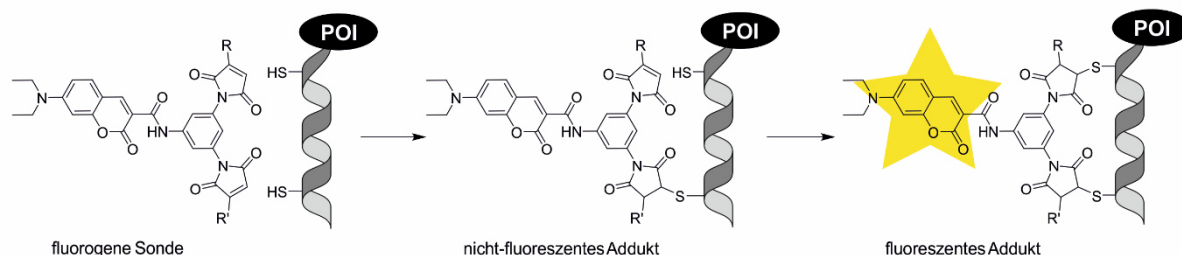
Nolan *et al.* durch Phagendisplay eine Gruppe von Fluorophor-bindenden Peptiden. Die „Fluorettes“ genannten Sequenzen konnten Texas Red, Rhodaminrot, Oregon Green 514 oder Fluorescein erkennen (Abb. 2.9A).<sup>[64]</sup> Von diesen Peptiden zeigte das TexasRed-bindende Tag (TR) die höchste Affinität. Jäschke konvertierte das TR-Peptid in ein reaktives Tag (ReacTR, Sequenz: CCGGGSKVILFEGPAGRWTWEPISGAPGSKVILFEGGPG). Durch das N-terminale Anhängen zweier Cysteinreste kann das Peptid in einer proximitäts-induzierten nukleophilen Substitution mit dem N- $\alpha$ -Chloroacetamid-konjugierten TexasRed reagieren. Nach einstündiger Behandlung von *E. coli*-Zellen mit 10  $\mu$ M reaktivem TexasRed zeigte das markierte Maltose-bindende Protein (MBP-ReacTR) im Cytosol eine deutliche Fluoreszenz.<sup>[65]</sup>

Barbas *et al.* unterwarfen eine Phagen-präsentierte Peptidbibliothek einer reaktionsbasierten Selektion. Ein 21-mer Peptid (rpf1368, Sequenz: CHNHQKATCRRMRSRETSVKK) wurde identifiziert, welches mit 1,3-Diketonverbindungen ein Enaminon bilden kann. Um eine Markierungsausbeute von 90% zu erreichen, wurde jedoch eine Reaktionszeit von 10 h benötigt.<sup>[66]</sup> Ebenfalls mithilfe des Phagendisplays suchten Weiss *et al.* nach Peptiden, die mit Hydraziden reagieren können. Das resultierende, hydrazidreaktive Peptid (HyRe, Sequenz: HKTNHSCHKREQEHCRTTT) wurde genetisch mit dem T4-Lysozym fusioniert. Nach einer Stunde Reaktionszeit in Zelllysat konnte eine chemische Modifikation des POI sowohl mit 1 mM Biotinhydrazid als auch mit 1 mM Rhodamin-B-Hydrazid beobachtet werden.<sup>[67]</sup>

Natsume *et al.* entwickelten eine Plattform, mit der es möglich ist, reaktive Peptidbinder für verschiedenste kleine Moleküle zu finden. Die Technik wird als „DIVERSE“-System (*Directed In Vitro Evolution of Reactive peptide tags via Sequential Enrichment*) abgekürzt. Dabei wird das 8-15 AS lange Polypeptidtag mit seiner cDNA verknüpft. Die Immobilisierung durch das Oberflächen-angebundene Reportermolekül führte zur Anreicherung der cDNA der reaktiven Peptide. Mittels PCR wurde diese DNA für die nächste Selektionsrunde amplifiziert. Durch die zellfreie Transkription der  $10^{14}$ -cDNA-Bibliothek und anschließende in vitro Selektion wird das Screening nicht von Polypeptidexpressions- oder Stabilitätsunterschieden beeinflusst.<sup>[68]</sup>



## A) Fluorette-Tag

B) dC10 $\alpha$ -Tag

**Abbildung 2.9:** Kovalente Markierung von Proteinen durch (A) das reaktive, Fluorophor-bindende Fluorette-Tag und (B) das Maleinimid-reaktive dC10 $\alpha$ -Tag.

Das rationale Design eines Maleinimid-reaktiven,  $\alpha$ -helikalen Peptids führte zum dC10 $\alpha$ -Tag, in welchem zwei Cysteinreste genau zwei Helixwindungen voneinander entfernt platziert wurden. Die komplementäre, minimalistische Sonde besteht aus einem Coumarinfarbstoff und zwei Maleimideinheiten, die als Fluoreszenzlöscher agieren. Durch die Addition der beiden Thiole kommt es zu einem Anschalten der Fluoreszenz (Abb. 2.9B). Dank der geringen Größe waren die Sonden in der Lage innerhalb von 30 min Inkubationszeit in HEK293-Zellen zu gelangen und dort sowohl C-terminal-modifiziertes Histon-2B als auch N-terminal modifiziertes Aktin zu markieren.<sup>[69]</sup>

Die hohe Affinität der Metall-chelatisierenden Peptidsequenzen bietet kurze Reaktionszeiten selbst bei niedrigen Konzentrationen an Markierungsagenz. So wurden für das Oligoaspartat-vermittelte Labeling von m1AChR Markierungszeiten von nur 5-7 min berichtet.<sup>[56]</sup> Erfolgreiche Proteinmarkierung bei geringen Sondenkonzentrationen wurde für das His<sub>10</sub>/Ni<sup>II</sup>:*tris*NTA-Paar demonstriert ( $C_{\text{trisNTA}} = 100 \text{ nM}$ ).<sup>[50]</sup> Diese Charakteristika sind vorteilhaft – besonders gegenüber den enzymvermittelten Markierungstechniken. Jedoch sind die Markierungen nicht-kovalenter Natur und bleiben deshalb reversibel. Um eine kovalente Bindung zwischen Erkennungssequenz und Metallkomplex zu knüpfen, wurden funktionelle Gruppen verwendet, die eine moderate Reaktivität besaßen. Auf diese Weise sollten unspezifische Markierungen gering gehalten werden. Die geringe Reaktivität

resultierte typischerweise in niedrigen Markierungsgeschwindigkeiten, was die Untersuchung schneller biologischer Prozesse durch *pulse-chase*-Experimente erschwert.

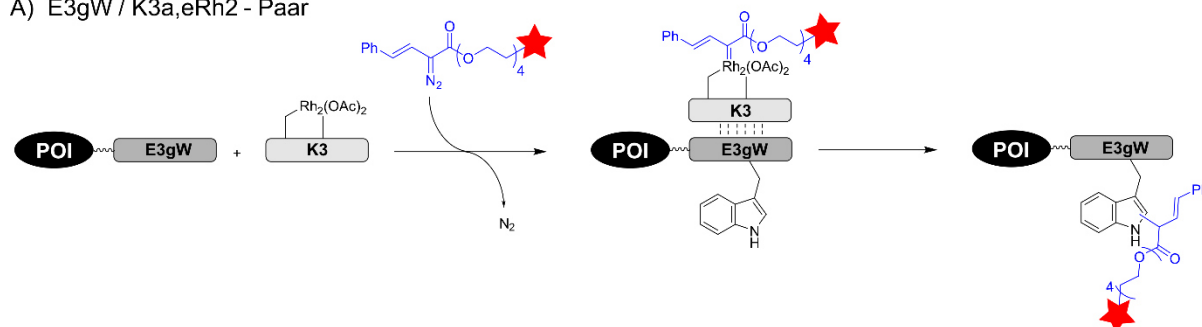
### 2.1.3 Markierungsstrategien mit Peptid-bindenden Tags

Peptide können einander mit hoher gegenseitiger Affinität binden. Ein Beispiel für solche hochaffinen Wechselwirkungen stellen die Coiled-Coil-Motive dar, bei welchen sich helikale Peptide umeinander winden und so eine Superhelix bilden. Im Jahr 1996 designten Hodges *et al.* ein Coiled-Coil-Peptidpaar *de novo*.<sup>[70]</sup> Die Dimerisierungsdomäne bestand aus fünf sich wiederholenden Heptaden: EVSALEK beim negativ geladenen E-Coil und KVSALKE für das positiv geladene K-Coil. Elektrostatische Wechselwirkungen treiben die selektive Heterodimerisierung voran ( $K_D = 1$  nM). Diese Coils wurden für die Reinigung, Immobilisierung und Detektion von Peptiden verwendet, die in *E. coli* exprimiert wurden. Dabei fungierte das E-Coil als genetisch kodierte Tag. Im Jahr 2008 veröffentlichte Matsuzaki eine Proteinmarkierungsstudie, in der die heterodimeren Coiled-Coil-Peptide K3 (KIAALKE)<sub>3</sub>, K4 (KIAALKE)<sub>4</sub> und E3 (EIAALEK)<sub>3</sub> – ursprünglich von Hodges entwickelt<sup>[71]</sup> – als Erkennungssequenzen für die selektive Markierung von Zelloberflächenrezeptoren eingesetzt wurden. Die Stabilität des E3/K3-Coiled-Coils liegt im nanomolaren Bereich ( $K_D \approx 70$  nM), wohingegen das E3/K4-Paar sogar noch stabiler ist ( $K_D \approx 6$  nM). Durch Inkubation mit 20 nM TMR-verknüpftem K3- bzw. K4-Peptid über 5 min konnte der E3-modifizierte Prostaglandin-E2-Rezeptor (EP3 $\beta$ R) selektiv mit einem Fluorophor markiert werden.<sup>[72]</sup> Diese Methode wurde auch verwendet, um den Oligomerisierungsstatus von Membranrezeptoren zu untersuchen.<sup>[73]</sup>

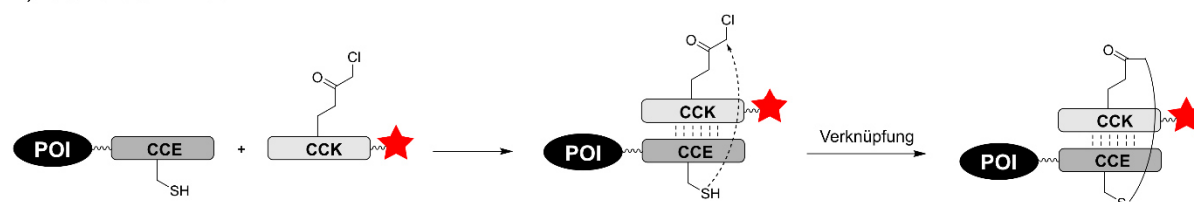
Um den potenziellen Verlust des Fluoreszenzmarkers während längerer Versuchszeiten zu vermeiden, wurden Strategien entwickelt, in denen die Bildung des Coiled-Coil-Motivs die Knüpfung einer kovalenten Bindung erleichtert. Ball *et al.* substituierten Aminosäuren an der Berührungsfläche des E3/K3-Coiled-Coil-Paares und positionierten dort einen Dirhodiumkatalysator, der die Alkylierung mit einer Diazoverbindung an einem Tryptophan auf dem komplementären Coil katalysiert.<sup>[74]</sup> Durch Behandlung mit 5  $\mu$ M K3<sub>a,e</sub>Rh<sub>2</sub>-Katalysator in Gegenwart von 100  $\mu$ M Biotindiazoreagenz über 16 h wurde das E3<sub>g</sub>W-tragende MBP in Zellysat selektiv biotinyliert (Abb. 2.10A).<sup>[75]</sup> Auch Xia *et al.* nutzten das Konzept der proximitätsinduzierten Reaktivität, indem das E3-Coil mit dem

nukleophilen Thiol eines Cysteinrestes ausgestattet (CCE-Peptid) und das K3-Coil mit einer elektrophilen  $\alpha$ -Chloroacetyleinheit modifiziert wurde (CCK-Peptid). Die Anordnung der beiden reaktiven Gruppen auf der Berührungsfläche der Coil-Peptide treibt die Verknüpfung des Sondenpeptids und des CCE-tragenden Zielproteins voran (Abb. 2.10B). Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde das Markierungspeptid als CCK-1-Dimer verwendet. Dennoch brauchte es mehr als 2 h, bis eine vollständige Ligation erreicht wurde. Die Größe des Labels steigt dabei auf 79 AS an.<sup>[76]</sup> Kürzlich präsentierten Matsuzaki *et al.* eine Amin-reaktive Verknüpfungsreaktion zwischen modifizierten E/K-Coiled-Coil-Peptiden.<sup>[77]</sup> Es wurden dem Markierungspeptid ein Carboxysulfosuccinimidester-Linker (R3CL-Peptid) und dem Erkennungstag ein Lysinrest (ER3-Peptid) zugefügt (Abb. 2.10C).

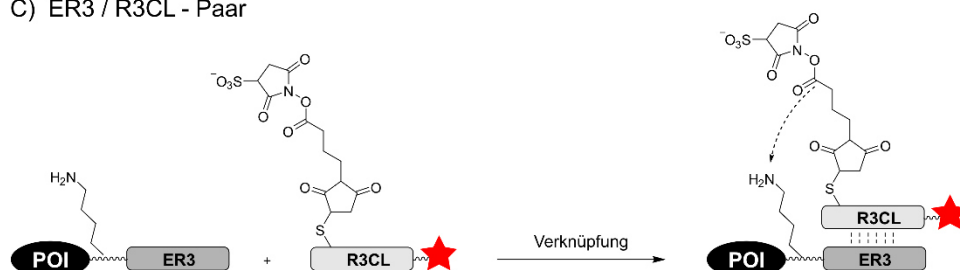
A) E3gW / K3a,eRh2 - Paar



B) CCE / CCK - Paar



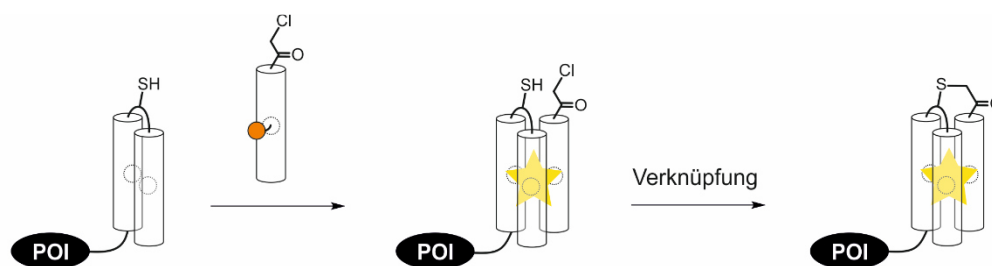
C) ER3 / R3CL - Paar



**Abbildung 2.10:** Proteinmarkierung durch Coiled-Coil-Wechselwirkungen. (A) Kovalente Markierung durch einen Rhodium-Katalysator am K3-Peptid und einem Diazosubstrat, (B) Proximitätsinduzierte Verknüpfungsreaktion zwischen einer elektrophilen Chloroacetylgruppe und einer Thiolseitenkette und (C) proximitätsinduzierte aminreaktive Verknüpfungsreaktion.

Nach 20 min Inkubationszeit mit 150  $\mu\text{M}$  R3CL-Peptid konnte ein hohes Maß an Verknüpfung zum ER3-markierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor auf der Oberfläche von CHO-Zellen beobachtet werden.

Ein anderes kleines, aber stabiles Coiled-Coil-Gerüst sind Leucinzipper. Für die Fluoreszenzmarkierung von Membranproteinen entwickelten Tamamura *et al.* im Jahr 2009 basierend auf der Kristallstruktur eines Coiled-Coil-Trimers vom GCN4 künstliche Leucinzipper-Peptide mit hoher wechselseitiger Affinität (ZIP-Peptide,  $K_D = 18 \text{ nM}$ ). Die 23 AS lange Sondenhelix ist mit einem umgebungssensitiven Farbstoff (4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, NBD) ausgestattet. Die anderen beiden Erkennungshelices sind über eine Schleifensequenz miteinander verbunden und bieten eine hydrophobe Tasche für den Farbstoff (A2-Erkennungstag, 49 AS) (Abb. 2.11). Der Chemokinrezeptor CXCR4 wurde genetisch mit dem A2-Tag fusioniert und in CHO-Zellen exprimiert. Die Inkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  NBD-Sondenpeptid führte zu einer Änderung der Fluoreszenz.<sup>[78]</sup> Um die chemische und biologische Stabilität der Markierung zu erhöhen, fügten Tamamura *et al.* dem Sondenpeptid in späteren Studien eine  $\alpha$ -Chloroacetylgruppe zu, die mit einem Cysteinrest der Schleifensequenz im A2-Tag eine Verknüpfungsreaktion eingehen kann.<sup>[79]</sup> Für die Markierung intrazellulärer Proteine wurde eine Oktaargininsequenz am C-Terminus des Sondenpeptids angebracht.<sup>[80]</sup>

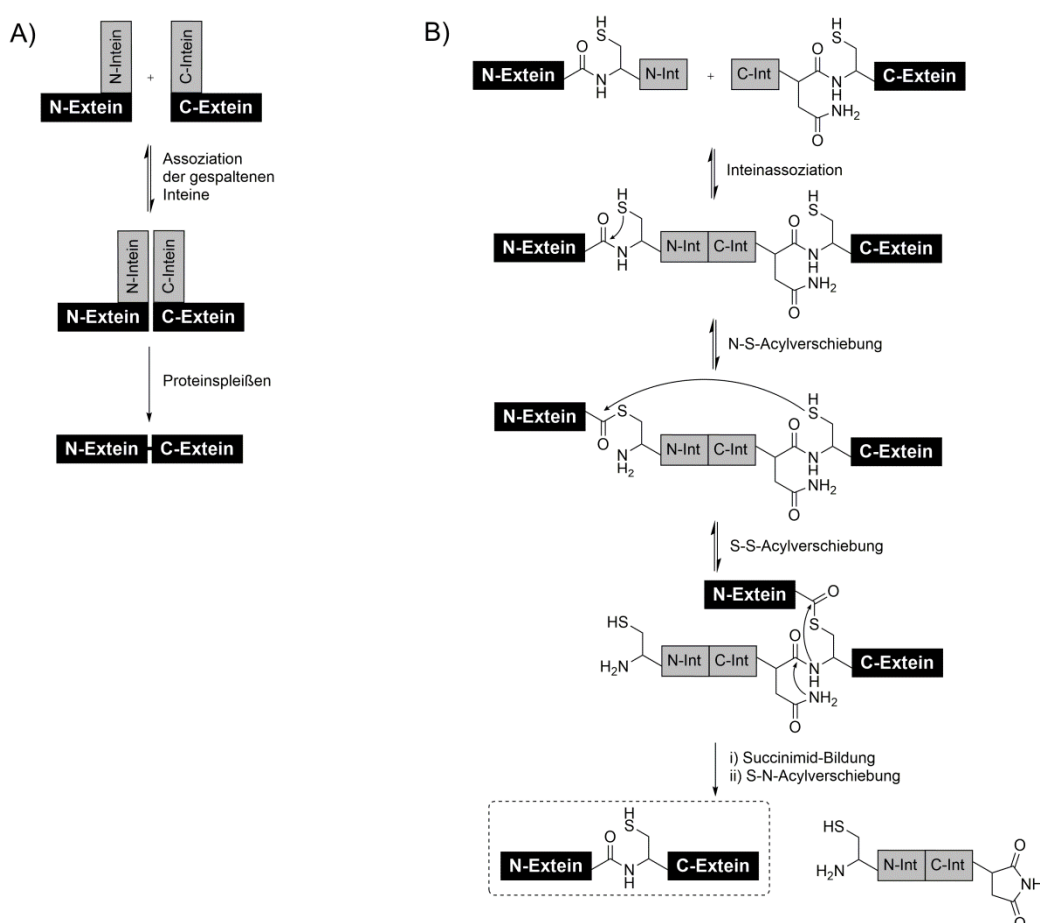


**Abbildung 2.11:** Proteinmarkierung durch das Leucin-Zipper-Tag, welches kovalente Modifikationen mit anschaltbarer Fluoreszenz ermöglicht.

Eine peptidbasierte Erkennung genetisch kodierter Tags jenseits von Coiled-Coil-Wechselwirkungen wurde von Haganir *et al.* 2004 vorgestellt. Die Markierungsstrategie beruht auf  $\alpha$ -Bungarotoxin (BTX, 74 AS); ein kurzes, aus Schlangengift gewonnenes Protein. Peptidsequenzen, die selektiv an BTX binden wurden über Phagendisplay selektiert und in Hinsicht auf eine erhöhte Affinität modifiziert.<sup>[81]</sup> Die resultierende 13 AS lange BTX-Bindungssequenz (BBS, Sequenz: WRYYESLEPYPD,  $K_D \approx 60 \text{ nM}$ <sup>[82]</sup>) wurde an die

extrazelluläre Domäne des AMPA-Rezeptors fusioniert und dort für die Analyse der Expression und des Membrantransports des markierten Rezeptors verwendet.<sup>[83]</sup> Währenddessen nutzten Sanes *et al.* nicht nur die BTX-Bindungssequenz, sondern zusätzlich ein Streptavidin-bindendes Peptid (SBP, Sequenz: MDEKTTGWRGGHVVEGLS-GELEQLRARLEHHPQGQREP,  $K_D \approx 25 \text{ nM}$ <sup>[82]</sup>), um das C-terminal modifizierte Vesikel-assoziierte Membranprotein (VAMP2) auf der Oberfläche lebender Zellen zu markieren. Die Zellen wurden dazu mit den entsprechenden Fluorophor-Protein-(BTX oder SA)-Konjugaten inkubiert.<sup>[82]</sup>

Die Entwicklung von Peptidpaaren für die gegenseitige Erkennung ist oftmals durch eine Abwägung zwischen Spezifität und Größe der Erkennungssequenz gekennzeichnet. Die *split intein*-vermittelte Proteinmarkierung umgeht diesen Kompromiss. Nach der Assoziation und Faltung der Inteinfragmente zur aktiven Domäne vermittelt diese die Verknüpfung der flankierenden Sequenzen und schneidet sich selbst heraus.



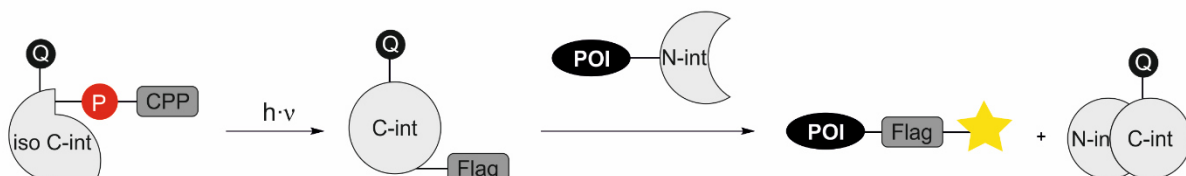
**Abbildung 2.12:** (A) Grundlegende Schritte der Intein-vermittelten PTS-Reaktion; (B) Mechanismus der Bindungsumlagerungen während der PTS am Beispiel von Cystein-flankierten Inteinen.

In Abbildung 2.12 sind das Schema der Intein-katalysierten Proteintranssplicing-Reaktion sowie ein beispielhafter Mechanismus dargestellt. Für die Markierung von Proteinen wird ein Inteinfragment genetisch mit dem POI fusioniert. Das andere Fragment wird synthetisch oder semisynthetisch dargestellt und mit der Reportergruppe ausgestattet. Dabei sollte dieses Inteinfragment möglichst kurz sein, um eine effiziente Synthese zu gewährleisten. Obwohl solche gespaltenen Inteine künstlich erschaffen wurden, fehlt es ihnen zumeist an ausreichender Spleiß-Geschwindigkeit und/oder Löslichkeit.<sup>[84]</sup> Das natürlich vorkommende *Npu* DnaE Intein zählt zu den schnellsten bekannten Inteinen mit einer Halbwertszeit von nur einer Minute.<sup>[85]</sup> Im Jahr 2012 rüsteten Camarero *et al.* das 36 AS lange C-Inteinfragment von *Npu* DnaE mit einem FRET-Paar aus, um die Fluoreszenz im ungespleißten Zustand zu unterdrücken (Abb. 2.13A). Unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Kits wurde dieses Fragment in Zellen eingeführt, um dort den intrazellulären Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 zu markieren. Die Proteintranssplicing-Reaktion (PTS-Reaktion) benötigte 2 h bis zur Vollständigkeit.<sup>[86]</sup>

A) gespaltenes Intein mit Fluorophor/Quencher-Paar



B) photoaktivierbares, gespaltenes Intein mit zellpenetrierendem Peptid



**Abbildung 2.13:** Proteinmarkierung durch die Proteintranssplicingreaktion (A) mit gespaltenem Intein mit Fluorophor/Löcher-Paar oder (B) mit photoaktivierbarem, zellpenetrierendem, gespaltenem Intein.

Die Gruppe von Kwon synthetisierte im Jahr 2015 ein *Npu* DnaE C-Intein, welches eine photoaktivierbare Estergruppe für die kontrollierte Aktivierung des Inteins trägt. Außerdem war es mit einem FRET-Paar für anschaltbare Fluoreszenz und mit einer

Oktaarginsequenz als zellpenetrierendes Peptid ausgestattet (Abb. 2.13B).<sup>[87]</sup> Mit diesem Inteinfragment konnte Maltose-bindendes Peptid in HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 30 min fluoreszierend markiert werden. Neben dem *Npu* DnaE Intein wurden noch weitere schnelle Inteine beschrieben wie das *Ava* DnaE Intein.<sup>[88]</sup>

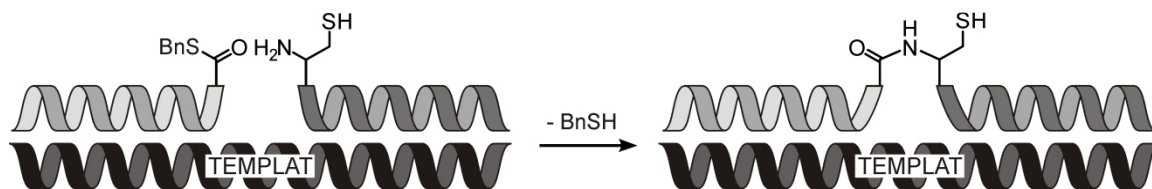
In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde das Histon H2B mit dem 102 AS langen *Ava* DnaE N-Intein fusioniert und in HEK293T-Zellen exprimiert. Die Markierung des Proteins in lebenden Zellen gelang nach einer Stunde Inkubationszeit mit *Npu* DnaE C-Intein, welches mit verschiedenen Reportergruppen ausgestattet war. Das *Npu* DnaE C-Intein wurde statt des *Ava* DnaE C-Inteins aufgrund der höheren Syntheseausbeuten verwendet.<sup>[89]</sup> Bereits 2014 konstruierte Mootz ein atypisches, natürlich vorkommendes gespaltenes Intein mit einem N-Inteinfragment von nur 25 AS Länge und einem C-Intein von 100 AS.<sup>[90]</sup> Kürzlich konnten Tampé *et al.* die Affinität des gespaltenen *Ssp* DnaB M86 Inteins, bestehend aus einem 11 AS langen N-Intein und einem 143 AS langen C-Intein, signifikant steigern. Dafür wurde das N-Intein am C-Terminus mit einer *tris*NTA-Einheit verknüpft und das C-Intein an seinem N-Terminus mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen. Dies steigerte die Affinität um ein 40-Faches und ermöglichte die Proteintranssplicingreaktion mit nanomalen Konzentrationen.<sup>[91]</sup> Um die Vorteile einer kurzen Peptiderkennungssequenz nutzen zu können – geringe Beeinflussung der Proteinlokalisierung und -bewegung – muss das POI mit dem kleineren Fragment genetisch fusioniert werden. Das bedeutet wiederum, dass das größere Inteinfragment (semirekombinant) synthetisiert und mit der Reportergruppe konjugiert werden muss, was anspruchsvoll ist.

## 2.2 Templat-vermittelte Acylreaktionen

### 2.2.1 Peptidtemplat-vermittelte Ligation

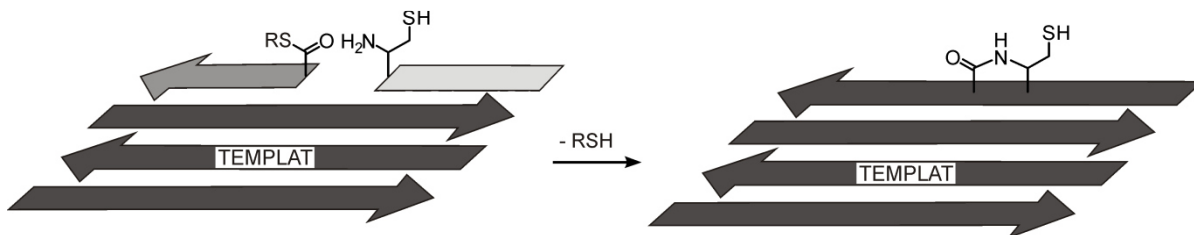
Neben den in Abschnitt 2.1.3 behandelten Proteinmarkierungsstrategien, die auf Peptidtemplaten beruhen, sind für die vorliegende Dissertation auch Arbeiten zu Szenarien der frühen molekularen Evolution von besonderem Interesse. Bereits 1996 untersuchten Ghadiri *et al.* ein  $\alpha$ -helikales Peptid mit einer Sequenz ähnlich dem des GCN4-Leucin-Zippers, das seine Bildung aus zwei Helixfragmenten katalysieren kann.<sup>[92]</sup> Indem die Peptidhelices sich zu einer Mehrfachhelix winden, wird die Bildung der Amidbindung nach

dem Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL)<sup>[93]</sup> zwischen den Fragmenten erleichtert (Abb. 2.14). Die NCL dient der chemoselektiven Verknüpfung zweier ungeschützter Peptidfragmente. Ein Peptid trägt C-terminal einen Thioester, während das andere Peptid mit einem N-terminalen Cystein ausgestattet ist. Ein Thiolaustausch führt zu einem Thioesterintermediat, welches sich durch eine S-N-Acylverschiebung zu einer stabilen Amidbindung an der Ligationsstelle umlagert. Die Effizienz des Replikationsprozesses ist in hohem Maße von der Stabilität des Templats anhängig. So haben sowohl pH-Wert<sup>[94]</sup> als auch Salzkonzentration<sup>[95]</sup> in der wässrigen Umgebung einen Einfluss auf die Katalyse.



**Abbildung 2.14:** Schema der autokatalytischen Replikation von helikalen Coiled-Coil-Peptiden nach dem Mechanismus der nativen chemischen Ligation.

Aber nicht nur helikale Coiled-Coils besitzen einzigartige und wohldefinierte Strukturen, die sie als Templat für die Selbstreplikation geeignet machen. Ashkenasy *et al.* zeigten 2009, dass auch  $\beta$ -Faltblattstrukturen ihre Replikation katalysieren können.<sup>[96]</sup> So sind die amphiphilen Glu-(Phe-Glu)<sub>n</sub>-Peptide in der Lage, antiparallele  $\beta$ -Faltblattaggregate in Wasser zu bilden, welche die Peptidligation und –replikation signifikant beschleunigen können. Die Peptide wurden mit C-terminalen Prolinresten versehen, da der fehlende Wasserstoff im Peptidrückgrat die Wasserstoffbrücken unterbricht und so zu mehr geordneten Strukturen statt zu langen Fasern führt. Abb. 2.15 veranschaulicht, wie die Kanten der  $\beta$ -gefalteten Aggregate als Templat für die gleichzeitige Interaktion mit den Vorläuferpeptiden dienen können.

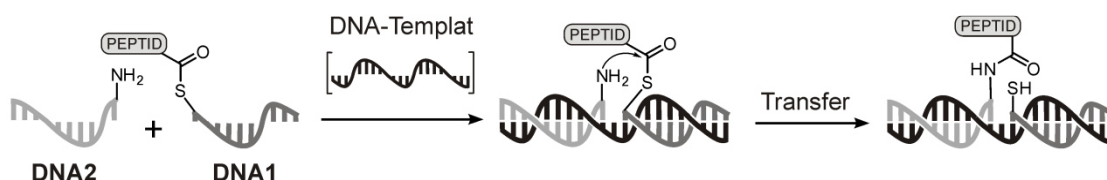


**Abbildung 2.15:** Schema der autokatalytischen Replikation von  $\beta$ -gefalteten Peptiden nach dem Mechanismus der nativen chemischen Ligation.



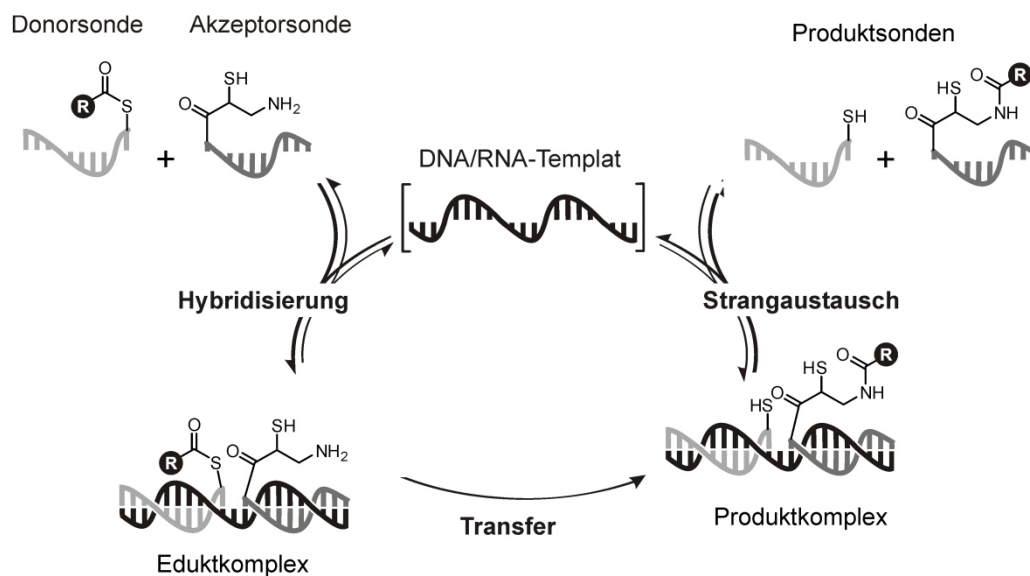
### 2.2.2 Nukleinsäuretemplat-vermittelte Acyltransferreaktionen

Joyce *et al.* machten sich ein DNA-Templat für die selektive Verknüpfung eines Peptids mit einem Oligonukleotid zu Nutze.<sup>[97]</sup> Dafür wurden Peptide über eine Thioesterbindung an das 5'-Ende eines thiolmodifizierten Oligonukleotids **DNA1** gebunden. Die Hybridisierung dieser DNA mit einem komplementären Oligonukleotidtemplat bringt das Peptid in räumliche Nähe zu dem benachbart hybridisierten Oligonukleotid **DNA2** mit einer 3'-Aminogruppe (Abb. 2.16). Das Templat schafft eine hohe effektive Konzentration der funktionellen Gruppen. So kann das Amin nukleophil am Carbonylkohlenstoff angreifen und eine Amidbindung entsteht zwischen **DNA2** und dem Peptid. Nach 30 h Reaktionszeit konnte das Reaktionsprodukt Peptid·**DNA2** in einer Ausbeute von knapp 90% detektiert werden.



**Abbildung 2.16:** Schema des Nukleinsäuretemplat-vermittelten Transfers eines Peptids auf ein Oligonukleotid.

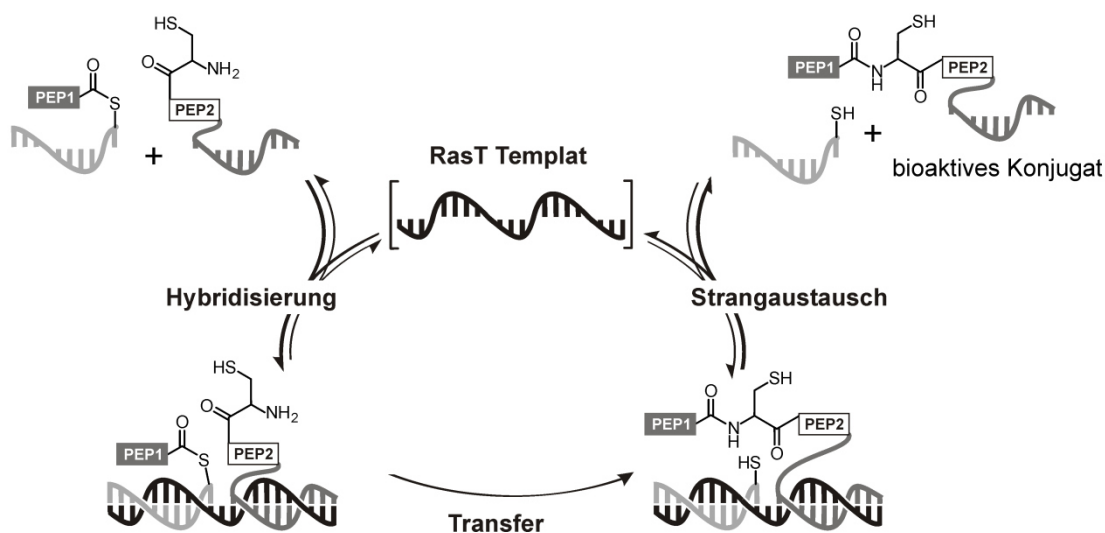
Bei dem beschriebenen DNA-Templat-kontrollierten Acyltransfer dient das Templat als Gerüst, an dem sich die Reaktanden in einer günstigen Anordnung positionieren können. Katalytische Aktivität zeigte das Templat indessen nicht. Anders verhielt es sich bei der von Seitz *et al.* entwickelten Nukleinsäuretemplat-vermittelte Acyltransferreaktion. Mit einem Mechanismus ähnlich dem der natürlichen chemischen Ligation<sup>[93]</sup> kommt es hierbei zu einer DNA-katalysierten *iso*Cystein-vermittelten Übertragung einer Reportergruppe (Abb. 2.17).<sup>[98]</sup> Ein mit einer Thiolfunktion ausgestatteter PNA-Strang trägt eine Thioester-gebundene Acylgruppe. Dieses Konjugat dient als Donorsonde. Ein Akzeptor-PNA-Konjugat ist mit einem Cystein verknüpft. Die benachbarte Hybridisierung mit einem DNA- oder RNA-Templat ruft einen proximitätsinduzierten Thiolaustausch hervor, welcher zur Bildung des Thioesterintermediats führt. Die intramolekulare S-N-Acylverschiebung fängt die Acylgruppe im neuen Akzeptorkonjugat ab.



**Abbildung 2.17:** Nukleinsäure-vermittelter Transfer einer Reportergruppe  $R$  ( $R$  = Dabcyl, Pyrenbuttersäure, Biotin).

Die Reaktion läuft unter Bedingungen eines dynamischen Strangaustausches ab und so erhält das Templat katalytische Wirksamkeit. Zudem verläuft der *iso*Cystein-vermittelte Acyltransfer schneller als die von Joyce *et al.* beschriebene Acylübertragung. In Anwesenheit äquimolarer Mengen an DNA-Templat war die Reaktion nach ca. 90 min vollständig. Bei einem Einsatz von substöchiometrischen Mengen Templat (0.01 Äq.) wurden Wechselzahlen von bis zu 402 erreicht. Das Reaktionsdesign erlaubt die nahezu freie Auswahl an Reportergruppen. Seitz *et al.* demonstrierten den Transfer eines Fluoreszenzlöschers (Dabcyl),<sup>[98]</sup> einer Fluorophorgruppe (Pyren)<sup>[99]</sup> und eines Biotins.<sup>[100]</sup> Die Übertragungsreaktion diente der Detektion von DNA oder RNA. Um die DNA-katalysierte native chemische Ligation auch unter extremen Bedingungen wie der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nutzen zu können, untersuchte die Gruppe von Seitz den Einfluss der Thioester- und Thiolstruktur auf die Reaktivität des Systems. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Alaninthioester bei einer vergleichbaren Ligationsgeschwindigkeit langsamer hydrolysieren als Glycynthioester.<sup>[101]</sup> Auf der „Thiolseite“ führte die Verwendung von *i*Cystein zu einer schnelleren Verknüpfung als bei der Cystein-vermittelten Ligation.<sup>[102]</sup> Die Möglichkeit die Reaktivität des Systems einstellen zu können, macht es besonders attraktiv für eine Anwendung in komplexen Umgebungen wie der PCR oder in Lebendzelleexperimenten.

Die Methode des Nukleinsäure-katalysierten Acyltransfers wurde von Seitz *et al.* auch auf den Transfer von Aminosäuren und sogar kleinen Peptiden auf Peptidyl-PNA-Konjugate ausgeweitet.<sup>[103]</sup> Ziel dieser Studien war es, zu erforschen, ob tumorspezifische DNA-Moleküle den Aufbau von apoptotischen Verbindungen bewirken können. Die **RasT**-katalysierte Übertragung einer Peptidylgruppe auf ein Peptid-PNA-Konjugat führte zur Bildung eines Peptids, das an die Bir3-Domäne von XIAP (*x-linked inhibitor of apoptosis proteins*) bindet (Abb. 2.18). In Anwesenheit einer tumorspezifischen DNA-Sequenz wurde also ein Peptid aufgebaut, welches XIAP bindet und dadurch die Aktivität von Caspase-9 wiederherstellt. Später wurde von Seitz *et al.* auch erfolgreich der RNA-vermittelte Aufbau des kationischen, amphipathischen Peptids (KLAKLAK)<sub>2</sub> untersucht, welches die Zellproliferation inhibiert.<sup>[104]</sup>

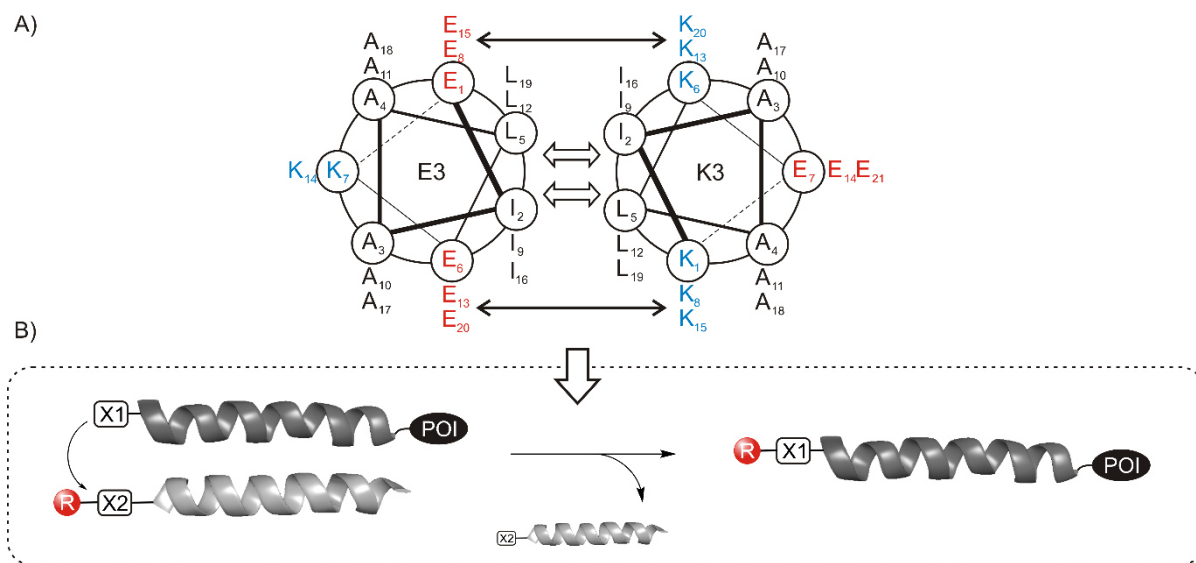


**Abbildung 2.18:** DNA-vermittelte Synthese eines bioaktiven Peptides.

# 3 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Peptidtemplat-basierte Methode zur selektiven Markierung von Proteinen auf der Oberfläche lebender Zellen zu entwickeln. Wie in Kapitel 1 erwähnt, sind Peptidsequenzen genetisch einfach zu kodieren und deshalb attraktive Erkennungstags für die Proteinmarkierung.

Aufgrund seiner kleinen Größe und der hohen wechselseitigen Affinität wurde das artifizielle E/K-Coiled-Coil-Motiv als Basis der molekularen Erkennung gewählt. Die von Litowski und Hodges<sup>[71]</sup> entwickelten Peptide K3 (KIAALKE)<sub>3</sub>, K4 (KIAALKE)<sub>4</sub> und E3 (EIAALEK)<sub>3</sub> besitzen eine netto positive (+3 für K3 und +4 für K4) bzw. negative (-3 für E3) Ladung. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen K und E Peptiden führen zu einer Heterodimerbildung (Abb. 3A), während die K-K- und E-E-Abstoßungen eine Homodimerisierung verhindern. Dies führt zu hohen gegenseitigen Affinitäten mit  $K_D$ -Werten im nanomolaren Bereich ( $K_D(E3/K3) = 60 \text{ nM}$ ,  $K_D(E3/K4) = 7 \text{ nM}$ ). Die Gruppe um Matsuzaki fand zudem heraus, dass die Fusion eines Zelloberflächenrezeptors mit dem E3-Peptid nicht toxisch ist und die Aktivität des Rezeptors nicht beeinträchtigt.<sup>[72]</sup> Um eine stabile Markierung des POI zu erreichen, sollte die Reportergruppe kovalent auf das Zielprotein übertragen werden. Strukturuntersuchungen des E3/K3-Coiled-Coils in Lösung mittels NMR zeigten, dass die Helices sich parallel anordnen.<sup>[105]</sup> Aus diesem Grund erscheint eine Positionierung der funktionellen Gruppen am N-Terminus der Peptide wie in Abb. 3B illustriert besonders vorteilhaft. Für die Übertragung des Reporters sollten verschiedene Reaktionstypen untersucht werden.



**Abbildung 3:** (A) Helixrad-Darstellung des E3/K3-Coiled-Coils, schwarze Pfeile stellen elektrostatische und weiße Pfeile hydrophobe Wechselwirkungen dar; (B) Peptidtemplat-kontrollierte Übertragung einer Reportergruppe R auf das Zielprotein.

Bei der von Hamachi *et al.* etablierten Liganden-dirigierten Tosylchemie (LDT) befindet sich zwischen Ligand und Reportergruppe ein Sulfonatbaustein als reaktive Gruppe. In einer  $S_N2$ -Reaktion der Sulfonsäureesterfunktion mit einem natürlichen, nukleophilen Aminosäurerest des POI wird das Sondenmolekül auf das Zielprotein übertragen und der Ligand freigesetzt.<sup>[106]</sup> Diese Markierungsreaktion wurde erfolgreich in lebenden Zellen und sogar Mäusen durchgeführt.<sup>[8a]</sup> Die von Seitz *et al.* entwickelte Acyltransferreaktion nach dem Mechanismus der nativen chemischen Ligation erlaubt ebenfalls die Übertragung und kovalente Anbindung einer Reportergruppe.<sup>[98, 103a, 107]</sup> Nach Hybridisierung der Sonden mit dem Nukleinsäuretemplat kommt es zu einem nukleophilen Angriff eines Thiols an die als Thioester gebundene Reportergruppe mit einer anschließenden intramolekularen S-N-Acylverschiebung. Studien geben Hinweise darauf, dass die Acyltransferreaktion auch intrazellulär stattfinden kann.<sup>[108]</sup>

Die Tosylchemie und der Acyltransfer nach dem Mechanismus der NCL sollten auf die Peptidtemplat-vermittelte Proteinmarkierung übertragen werden. Nach erfolgreicher Adaption der Reaktionstypen sollten diese Übertragungsreaktionen hinsichtlich ihrer Spezifität und Reaktionsgeschwindigkeit *in vitro* untersucht werden. Um schnelle biologische Prozesse verfolgen zu können, ist eine Strategie mit möglichst kurzen Markierungszeiten vorteilhaft. Zudem sollte eine modulare Synthese der Überträger-

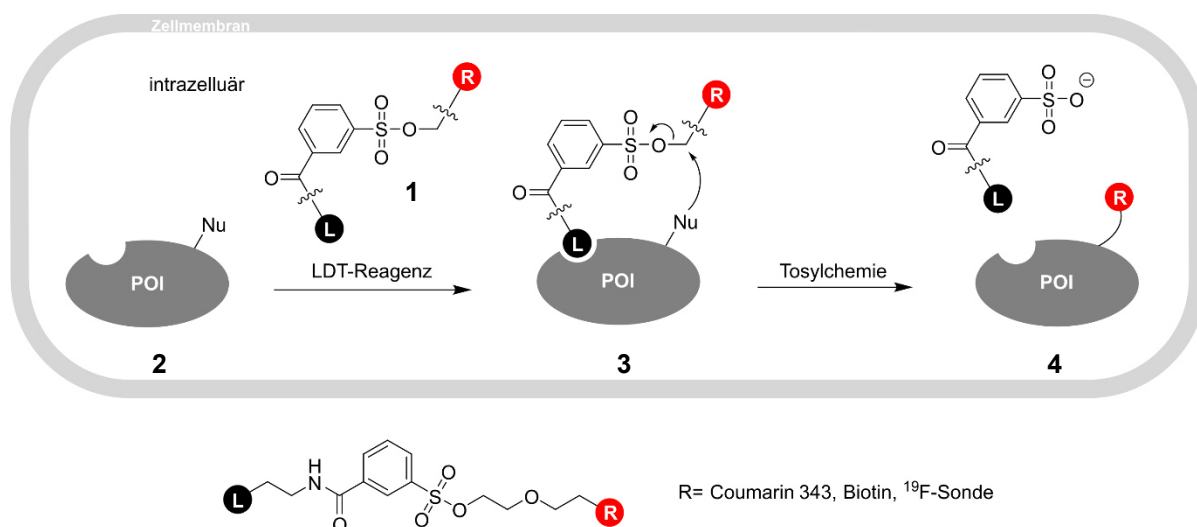
sonden etabliert werden, um ohne erhöhten synthetischen Aufwand eine vielfältige Auswahl an Reportermolekülen zu ermöglichen. Darüber hinaus sollte der Coiled-Coil-vermittelte Transfer einer Reportergruppe auf kleine Proteine *in vitro* angewendet werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Annette Beck-Sickinger (Universität Leipzig) sollte diese Proteinmarkierungsstrategie auch für die selektive Fluoreszenzmarkierung von Membranproteinen auf lebenden Zellen etabliert werden.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Alkyltransferreaktion mit Sulfonatlinkern

### 4.1.1 Test des Grundprinzips des Peptidtemplat-vermittelten Alkyltransfers

Die von Hamachi *et al.* vorgestellte Liganden-dirigierte Tosylchemie (LDT) beruht auf der engen Wechselwirkung eines Liganden mit seiner entsprechenden Bindungstasche am Zielprotein (Abb. 4.1). Für die Markierung des POI wird der Ligand **L** über einen elektrophilen Phenylsulfonatlinker **1** mit einer Reportergruppe **R** verknüpft. Durch Bindung des Liganden an das Protein (**2**) sind nukleophile Aminosäureseitenketten in der Nähe der Bindungstasche in der Lage, in einer  $S_N2$ -Reaktion am Sulfonatbaustein anzugreifen und den Liganden dabei freizusetzen. Durch Verdrängung des Liganden durch einen anderen Binder kann die Aktivität des Enzyms wiederhergestellt werden.



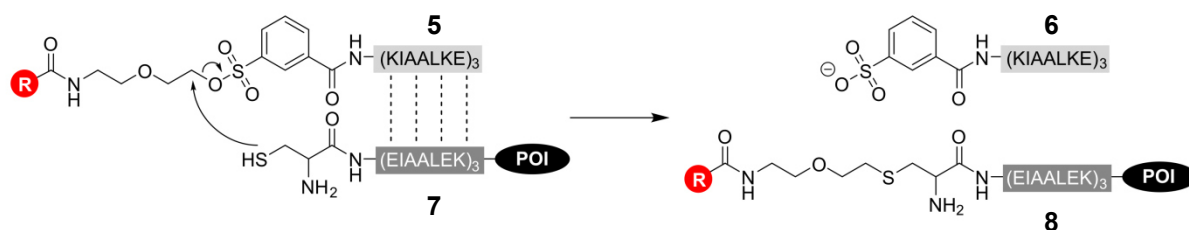
**Abbildung 4.1:** Schema der LDT-basierten Markierung von endogenen Proteinen (L = Ligand, R = Reportergruppe, Nu = nukleophile Aminosäure).

Als Reportergruppen wurden Biotin, 7-Diethylaminocoumarin und eine  $^{19}\text{F}$ -NMR-Sonde eingesetzt.<sup>[8a]</sup> Vorteilhaft ist, dass die Sonden membranpermeabel sind und so eine intrazelluläre Markierung ermöglichen. Ein Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass ohne genaue Kenntnisse der Ligandenumgebung die Bindungsstelle des Reporters schwer vorherzusehen ist. Befinden sich mehrere nukleophile Seitenketten in räumlicher Nähe, könnte es zu einer Mehrfachübertragung des Reporters kommen, in Abwesenheit von nukleophilen Gruppen eventuell zu gar keiner Markierung. Die Adaption dieser Markierungsstrategie für eine Peptidtemplat-kontrollierte Reaktion umgeht diese Nachteile, da die Anordnung des E/K-Coiled-Coil-Paares wohl definiert ist.

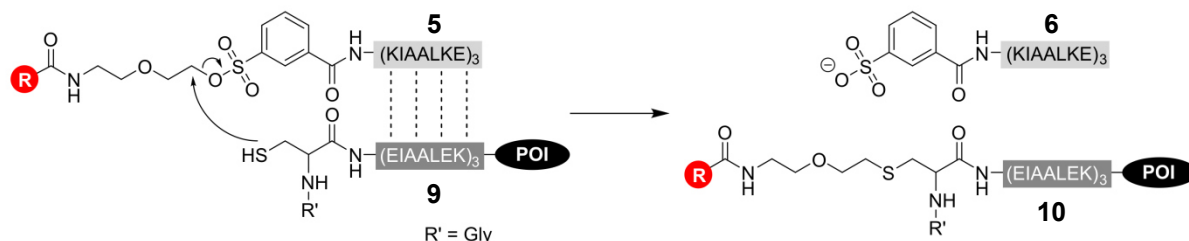
Bei der Mehrzahl der Membranproteine befindet sich auf der extrazellulären Seite der *N*-Terminus und entsprechend wird auch die Peptiderkennungssequenz an dieses Ende des POI fusioniert werden. Um eine gute Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen zu erreichen, sollten sich diese an den *N*-Termini der Coiled-Coil-Peptide befinden. Die Gruppe um Matsuzaki verwendete sowohl das negativ geladene E3-Peptid als auch das positiv geladene K3-Peptid als genetische kodierte Erkennungssequenz für die Proteinmarkierung und fand heraus, dass bei der Fusion des K-Peptids mit dem Zielprotein die E/K-Wechselwirkungen auf der Zelloberfläche gestört werden, während sich bei Verwendung des E3-Tags stabile Coiled-Coils ausbildeten.<sup>[72]</sup> Für die Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion wird das E3-Peptid zudem mit einem Cystein *N*-terminal funktionalisiert (**7**), da die Thiolfunktion der Seitenkette ein potentes Nukleophil darstellt (Abb. 4.2A). Ebenfalls untersucht wird die Alkyltransferreaktion mittels eines Cysteinrestes, welcher nicht den *N*-Terminus bildet (**9**, Abb. 4.2B). Dies ist z.B. relevant für die Proteinmarkierung in Prokaryonten, die die Proteinbiosynthese stets mit einem Formylmethionin beginnen.<sup>[109]</sup> Durch die Wechselwirkung zwischen den E3- und K3-Coiled-Coil-Peptiden ist die Thiolfunktion in **7** bzw. **9** in der Lage, nukleophil am Sulfonatlinker in **5** anzugreifen und so die Reportergruppe **R** kovalent auf das POI zu übertragen. Dabei kommt es zu keiner Ligation zwischen den Peptiden, sodass der Massenzuwachs am Zielprotein gering bleibt.



## A) terminales Cystein

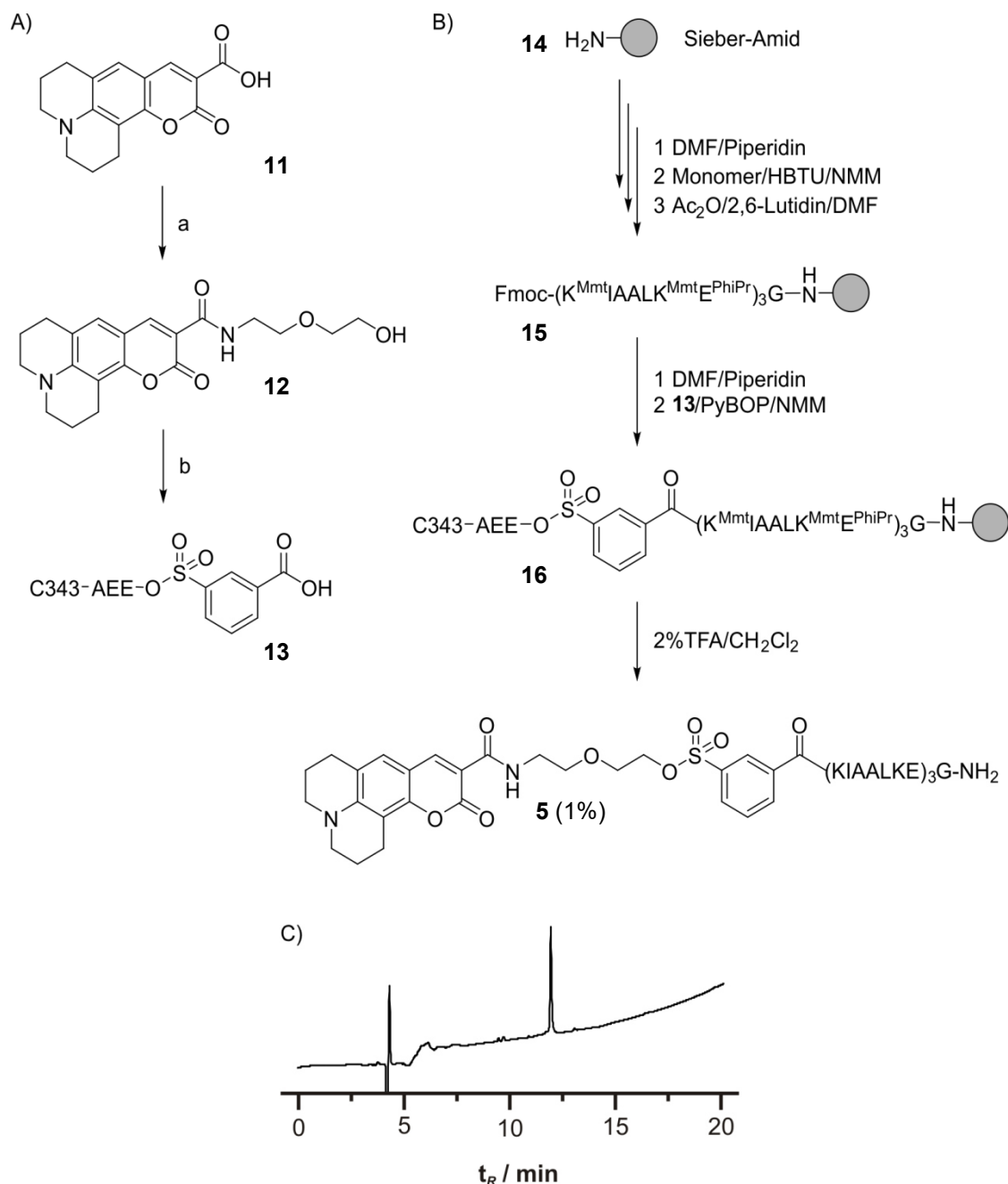


## B) internes Cystein



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der Proteinmarkierung durch die Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion bei der (A) Cys-E3 oder (B) Gly-Cys-E3 als Erkennungssequenz dient.

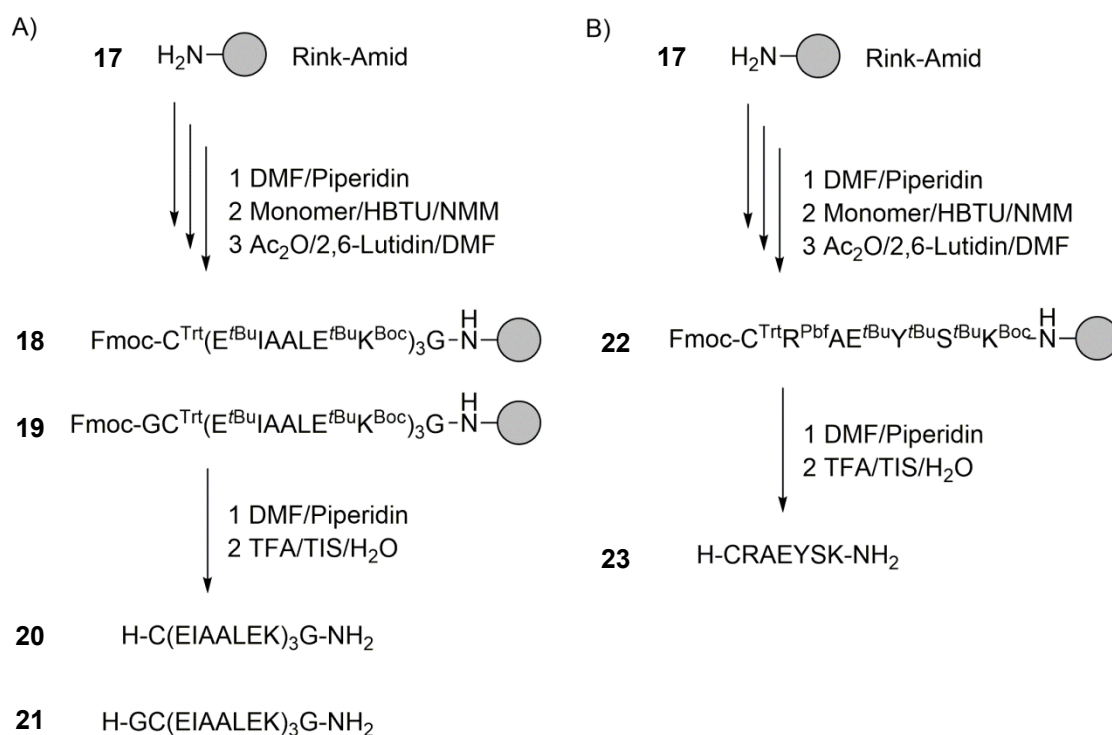
In dem Donorpeptid **5** ist die Reportergruppe über einen Sulfonatlinker an den N-Terminus des K3-Peptides gebunden. In der Festphasenpeptidsynthese von **5** sollte der Reporter und der Sulfonatlinker als ein Baustein (**13**) eingeführt werden (Abb. 4.3A). Die Synthese von **13** ging von dem Fluoreszenzfarbstoff Coumarin 343 (**C343**, **11**) aus, der mit *N*-(Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid·HCl (EDC) und *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) aktiviert wurde. Die Umsetzung mit 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (AEE) lieferte **12** in 77% Ausbeute. Anschließend wurde **12** unter Ausschluss von Wasser in Pyridin und Dichlormethan mit 3-(Chlorosulfonyl)-benzoesäure zum Sulfonatbaustein **13** verknüpft. Der ursprünglich geplante Einsatz des Bausteins in der Festphasenpeptidsynthese am Rink-Amid-Harz erwies sich als nicht gangbar. Während der Abspaltung der Peptidprodukte von der festen Phase mittels Trifluoressigsäure (TFA) kommt es zu einer raschen Solvolyse von Alkyltosylaten über  $\beta$ -Eliminierung.<sup>[110]</sup> Unter den von Winstein *et al.* charakterisierten primären Alkyltosylaten hatten die unverzweigten jedoch die niedrigste Solvolysegeschwindigkeit, sodass die Festphasensynthese von **5** mithilfe eines supersäurelabilen Sieber-Amid-Harzes (**14**) durchgeführt werden konnte. Der Stamm des K3-Peptids wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie aufgebaut (Abb. 4.3B).



**Abbildung 4.3:** (A) Synthese des Coumarin-Sulfonatbausteins **13**; a) EDC, HOBt, DIPEA, 2-(2-Aminoethoxy)ethanol, DMF, 16 h, RT, 77%; b) 3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C → RT, 27%. (B) Festphasensynthese des Donor-K3-Peptids **5**; (C) Chromatogramm der Verbindung **5**.

Hierbei wurden super-säurelabile Schutzgruppen für die Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in den Seitenketten verwendet: Fmoc-Lys(Mmt)-OH und Fmoc-Glu(PhiPr)-OH. Der Baustein **13** wurde anschließend durch einen manuellen Kupplungsschritt eingeführt. Die Freisetzung des Produkts **5** erfolgte durch Behandlung des Harzes mit einer 1%igen TFA-Lösung in Dichlormethan. Die Cystein-tragenden E3-Peptide **20** und **21** wurden mittels automatisierter Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie am Rink-Amid-Harz (**17**)

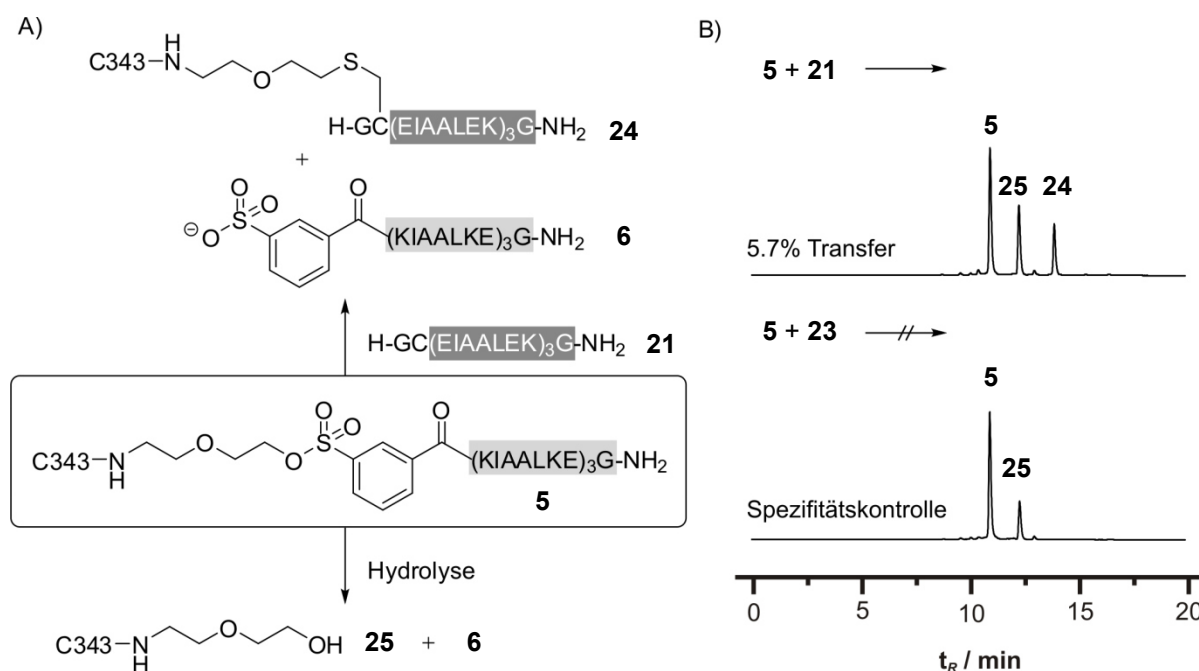
synthetisiert (Abb. 4.4A). Nach dem Entschützen der *N*-Termini wurden die Cysteinylopeptide **20** und **21** mit TFA vom Harz abgespalten. Als Selektivitätskontrolle wurde ein weiteres Cysteinylopeptid **23** mit einer beliebigen Aminosäuresequenz dargestellt, welches keine Coiled-Coil-Wechselwirkungen mit dem Donor-K3-Konjugat **5** eingehen kann. Die Synthese und Freisetzung vom Rink-Amid-Harz erfolgten analog zu den Cysteinylopeptiden **20** und **21** (Abb. 4.4B).



**Abbildung 4.4:** Festphasensynthese der Cysteinylopeptide **20**, **21** und **23**.

Das an der festen Phase synthetisierte Sulfonat-K3-Peptid **5** wurde dann mit den Cysteinylopeptiden **21** und **23** zur Reaktion gebracht. Dafür wurde Phosphatpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP) entgast und auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) diente als mildes Reduktionsmittel für eventuell oxidierte Cysteine. Wässrige Stammlösungen der Peptide wurden in Puffer gelöst, sodass in einem Gesamtvolumen von 100 µL eine Endkonzentration von 5 µM erreicht wurde. Nach 24 h wurden Aliquote entnommen und der Reaktionsfortschritt mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC untersucht. In Abbildung 4.5B sind die Chromatogramme gezeigt, die bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm und einer Emissionswellenlänge von 442 nm aufgenommen wurden. Neben dem Signal der Ausgangsverbindung war in beiden Fällen das Auftreten des fluoreszierenden Hydrolyseproduktes **25** zu beobachten, welches auch

bei der Inkubation von **5** in Puffer allein erschien. Eine Transferreaktion trat nicht auf, wenn das Sulfonat-K3-Peptid **5** mit dem Kontrollpeptid **23** inkubiert wurde (Spezifitätskontrolle, Abb. 4.5B). Im Gegensatz dazu entstand bei der Reaktion zwischen **5** und dem Cysteinyl-E3-Peptid **21** ein neues fluoreszierendes Produkt. Basierend auf den Flächenintensitäten der beobachteten Peaks entspricht dies einer Transferausbeute von 5.7%.

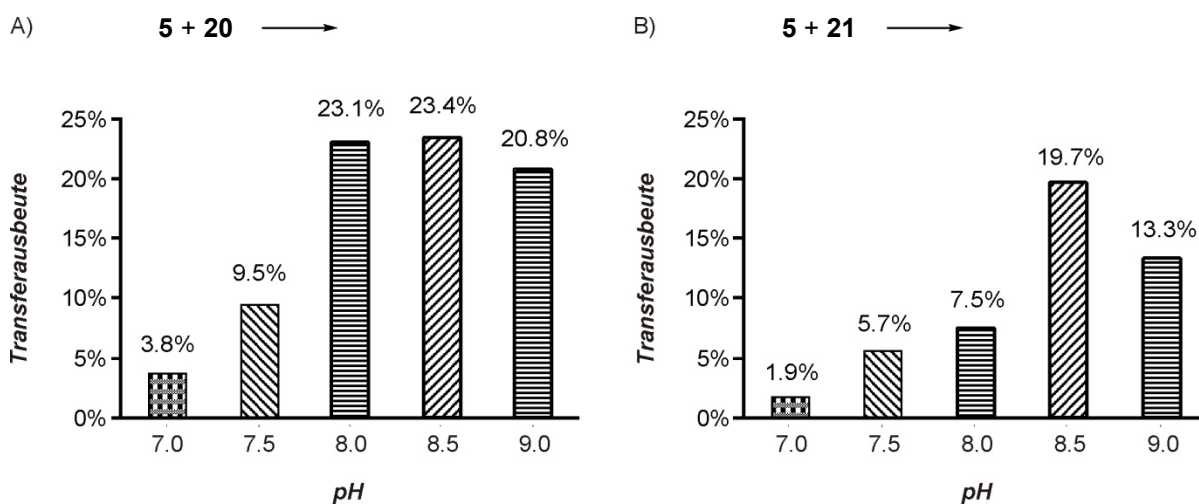


**Abbildung 4.5:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion zwischen dem Sulfonat-K3-Peptid **5** und dem Cysteinyl-E3-Peptid **21** bzw. dem Cysteinylpeptid **23** (= Spezifitätskontrolle). (B) Fluoreszenz-detektierte HPLC-Analyse nach 24 h Reaktion zwischen **5** und **21** (oben) oder **5** und **23** (unten). Bedingungen: 5  $\mu\text{M}$  Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7.5, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 346$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 442$  nm.

#### 4.1.2 Optimierung des Peptidtemplat-vermittelten Alkyltransfers

Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion prinzipiell in der Lage ist, einen Fluorophor von einem Donor- auf ein komplementäres Akzeptorpeptid zu übertragen, ist die beobachtete Transferausbeute zu gering, um für die Markierung von Zielproteinen in Lebendzellexperimenten nützlich zu sein. Da die Nukleophilie der Thiolgruppe eine Abhängigkeit vom pH-Wert besitzt ( $\text{pK}_{\text{A}(\text{Cys-SH})} = 8.33$ ), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch ein Anheben des pH-Werts der Reaktionslösung auch ein Anstieg der Transferausbeute erreicht werden kann. Beide Cysteinyl-E3-Peptide, **20** und **21**, wurden deshalb bei pH-Werten zwischen 7.0 und 9.0 mit dem Donorpeptid **5** zur Reaktion gebracht. Abbildung 4.6 zeigt die Transferausbeuten der

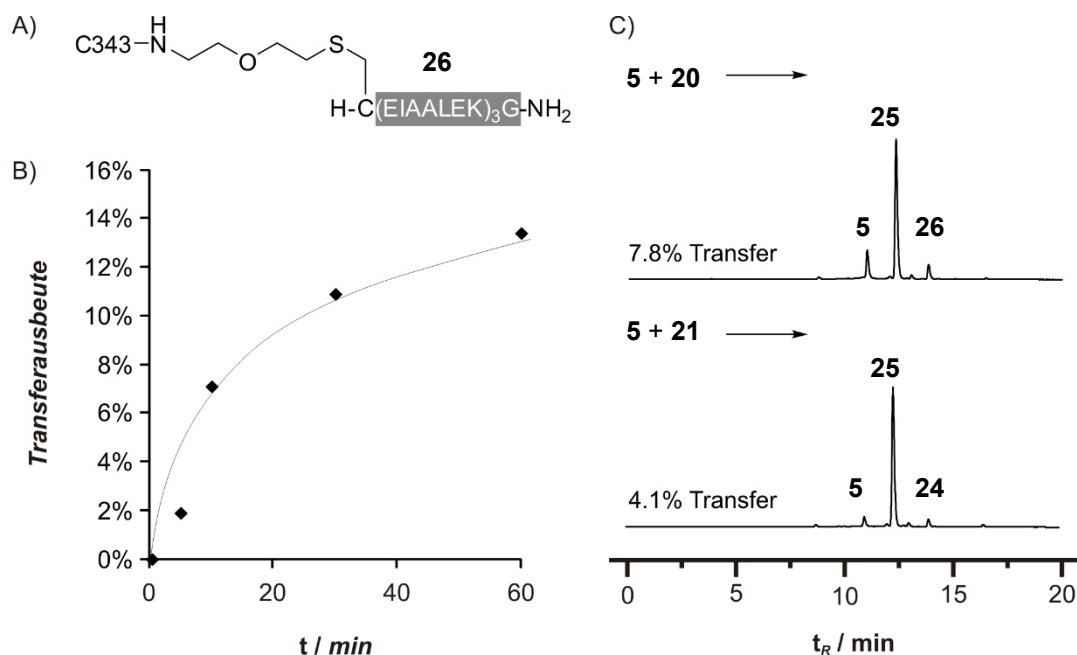
Reaktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung. Ein Ansteigen der Werte bis zu pH 8.5 unterstützt die Vermutung, dass unter neutralen Bedingungen die Nukleophilie der Cysteinseitenkette zu gering ist, um effektiv die Sulfonatgruppe anzugreifen. Auf der anderen Seite beschleunigt ein basisches Milieu zugleich die  $\beta$ -Eliminierungsreaktion am Sulfonat und somit zugleich den Zerfall von **5**, womit sich das Abfallen der Transferausbeuten über pH 8.5 hinaus erklären lässt. Es ist außerdem zu erkennen, dass bei jedem untersuchten pH-Wert die Ausbeuten des E3-Peptids mit terminalem Cystein (**20**) höher sind als die des Peptids mit dem internen Cystein (**21**). Dies könnte an der größeren Flexibilität oder der geringeren sterischen Abschirmung liegen. Die höchsten Transferausbeuten wurden mit ca. 20% für das interne Cysteinylpeptid **21** bei pH 8.5 und mit ca. 23% für **20** bei pH 8/8.5 erreicht.



**Abbildung 4.6:** Ausbeuten an Transferprodukt nach 24 h in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung bei Reaktion zwischen Sulfonat-K3-Peptid **5** und (A) dem E3-Peptid mit terminalem Cystein **20** bzw. (B) dem E3-Peptid mit internem Cystein **21**; Bedingungen: 5  $\mu$ M Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, RT.

Für die Markierung von Proteinen in Lebendzellexperimenten sind geringe Reaktionszeiten und geringe Konzentrationen an Markierungsagens wünschenswert, um Nebenreaktionen zu vermeiden und auch schnelle biologische Prozesse untersuchen zu können. Im Folgenden wurde die Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion unter Bedingungen untersucht, die für eine Anwendung in biologischen Experimenten attraktiv sind. Die Untersuchung von Proben, die der Reaktion des Donorpeptids **5** mit dem terminalen Cysteinylakzeptor **20** nach 5, 10, 30 und 60 min entnommen wurden, zeigte, dass bei einem pH-Wert von 8.0 innerhalb einer Stunde eine maximale Transferausbeute von 13.4%

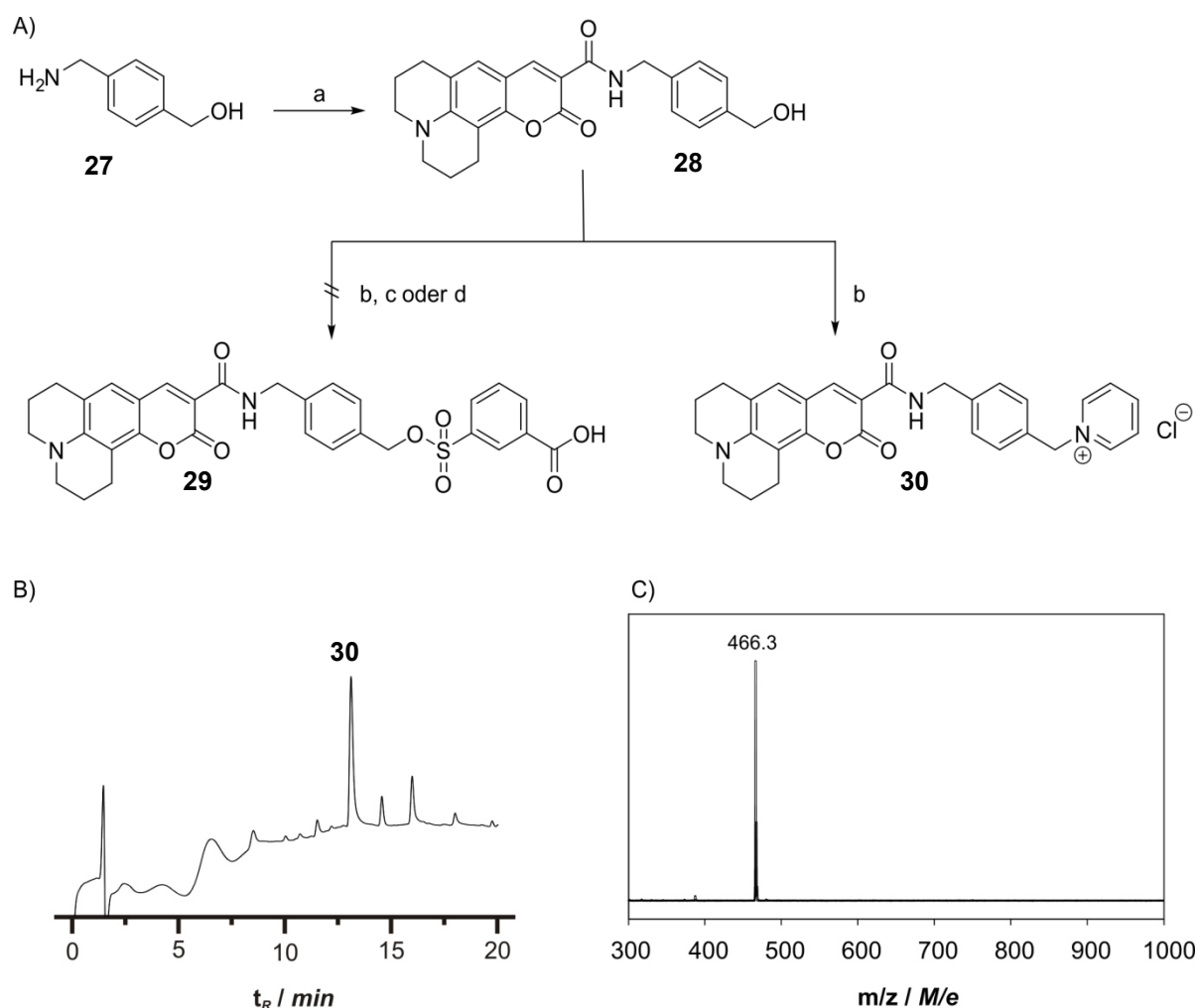
erreicht werden kann (Abb. 4.7B). Reduziert man zudem die Konzentration beider Peptide auf 500 nM, sind selbst bei pH 8.5 nach 24 h nur geringe Ausbeuten an Transferprodukt zu detektieren (7.8% für **20**, 4.1% für **21**, Abb. 4.7C). Unter diesen Bedingungen ist stattdessen die Hydrolyse des Sulfonat-K3-Peptids zu Verbindung **25** die Hauptreaktion.



**Abbildung 4.7:** (A) Struktur des fluoreszierenden Transferprodukts **26**; (B) Ausbeute an **26** in Abhängigkeit von der Zeit bei der Reaktion zwischen **5** und **20**, Bedingungen: 5  $\mu$ M Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 8.0, RT; (C) Fluoreszenz-detektierte HPLC-Analyse nach 24 h Reaktion zwischen **5** und **20** (oben) oder **5** und **21** (unten). Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 8.5, RT,  $\lambda_{\text{Ex}} = 346$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 442$  nm.

Aus diesem Grund wurde versucht, den Sulfonatbaustein reaktiver zu gestalten. In Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Christian Richter wurde versucht, (4-Aminomethylphenyl)methanol (**27**) als Alkohol für den Sulfonsäureester einzusetzen (Abb. 4.8A). Zum einen versprach der Benzylring eine Stabilisierung des pentavalenten Übergangszustands der  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion und somit eine Beschleunigung der Transferreaktion. Zum anderen kann die angestrebte Verbindung **29** keiner  $\beta$ -Eliminierung mehr unterlaufen. Nach der Aktivierung mittels EDC und HOBt in Anwesenheit von DIPEA wurde Coumarin 343 (**11**) mit **27** zum Amid **28** umgesetzt. Die Kupplung von **28** mit 3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure in trockenem Pyridin und Dichlormethan analog der Synthese von **13** lieferte jedoch nicht das gewünschte Produkt **29**. Stattdessen konnte eine Verbindung mit einer Masse von 465 Da isoliert werden. NMR-Analysen zeigten, dass es sich dabei um das alkylierte Pyridin **30** handelt. Es wird angenommen, dass das intermediär gebildete Benzylsulfonat **29** durch das

Lösungsmittel Pyridin nukleophil substituiert wird. Die als „Menschutkin-Reaktion“<sup>[111]</sup> bekannte Alkylierung tertiärer Amine wurde bereits für die Substitution von Benzylbenzensulfonaten mit Pyridin beschrieben.<sup>[112]</sup> Die Umsetzungen von **28** zum Sulfonat unter Pyridin-freien Bedingungen mit DIPEA oder Triethylamin (TEA) als weniger nukleophile Basen in Dichlormethan gelangen nicht. In Anbetracht der Reaktionsgeschwindigkeiten, die mit dem Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfer erreicht wurden (vgl. Kapitel 4.2), wurde eine weitere Optimierung der Sulfonatsynthese unterlassen.



**Abbildung 4.8:** (A) Schematische Darstellung der Versuche zur Synthese des Benzylsulfonatbausteins **29**; a) EDC, HOBt, DIPEA, Coumarin **11**, DMF, 12 h, RT, 64%; b) 3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2h, 0°C; c) DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12h; d) TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12h. (B) Chromatogramm und (C) ESI-MS des isolierten Pyridin-Substitutionsprodukts **30**.

### 4.1.3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion in der Lage ist, eine Reportergruppe von einem Donor-Peptid-Konjugat selektiv und kovalent auf ein Akzeptorpeptid zu übertragen. Hierfür wurde in Anlehnung an die von Hamachi *et al.* entwickelte Liganden-dirigierte Tosylchemie<sup>[8a, 106]</sup> das K3-Coiled-Coil-Peptid *N*-terminal mit einem Fluorophor-Sulfonat-Baustein funktionalisiert. Transferexperimente in Puffer belegten, dass bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Sulfonat-K3-Peptid die Reportergruppe auf die Cysteiny-E3-Peptide übertragen wird, jedoch nicht auf ein Cysteinylopeptid mit randomisierter Sequenz. Vorteilhaft für z.B. die Markierung bakterieller Proteine ist, dass der Transfer auch mit einer E3-Erkennungssequenz gelang, bei der Cystein nicht den *N*-Terminus bildet. Da es sich bei dem E3/K3-Coiled-Coil-Paar um ein *de novo* designtes Motiv handelt,<sup>[71]</sup> sind unspezifische Wechselwirkungen mit endogenen Proteinen unwahrscheinlich.<sup>[72]</sup> Aus diesem Grund sollte die Anwendung dieser Transferreaktion für die Proteinmarkierung in lebenden Zellen prinzipiell möglich sein. Bei einem physiologischen pH-Wert wurden jedoch selbst bei langen Reaktionszeiten (24h) nur geringe Ausbeuten von unter 10% an Transferprodukt erreicht. Für die Untersuchung schneller biologischer Prozesse oder von Proteinen mit geringem Expressionsniveau bedarf es Strategien mit nur kurzen Markierungszeiten und hoher Markierungsausbeute.

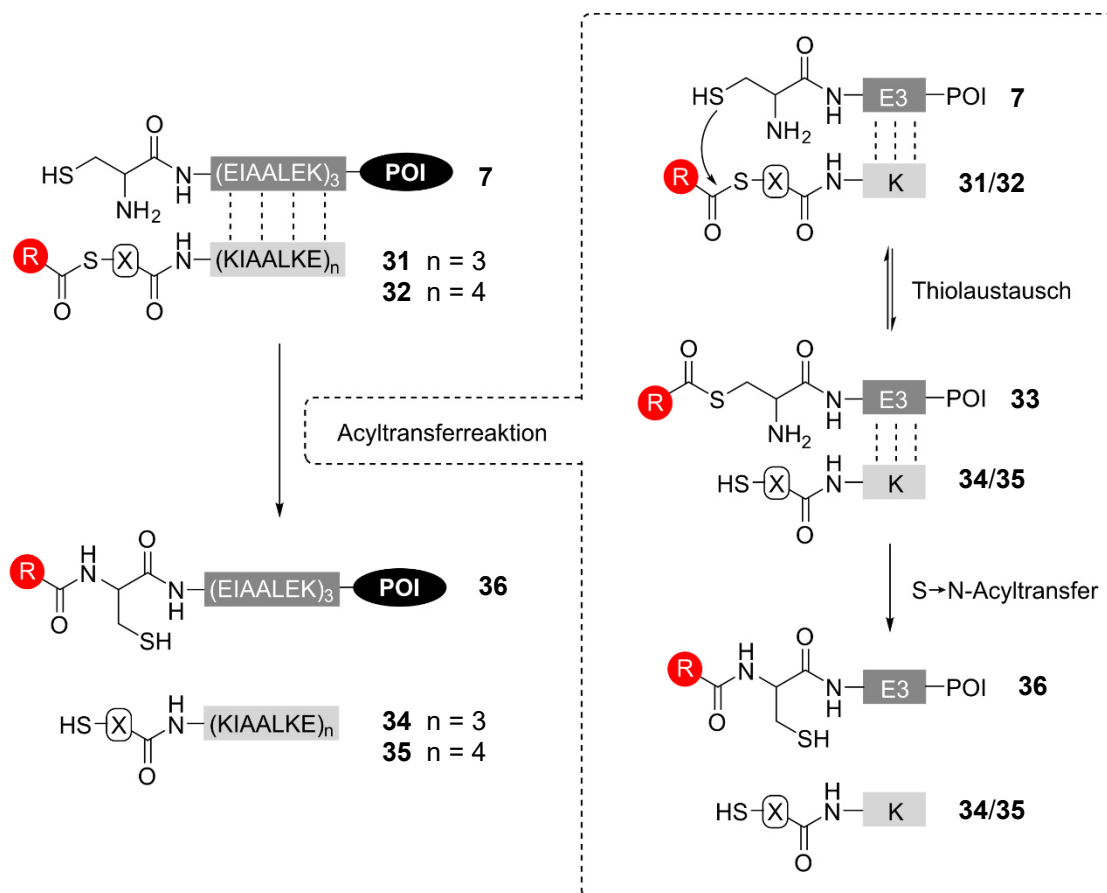


## 4.2 Acyltransferreaktion von Thioestern auf Cysteinylpeptide

Die für den Nachweis kleinster Mengen DNA entwickelte Oligonukleotid-vermittelte Acyltransferreaktion kann eine Reportergruppe effizient von einem Donor-Konjugat auf einen Akzeptor übertragen - auch unter Bedingungen hoher Verdünnung, bei denen herkömmliche bimolekulare Reaktionen nicht mehr ablaufen (siehe Kapitel 2.2.2).<sup>[100]</sup> Dabei führt die Hybridisierung der Sonden mit dem komplementären Ziel-Oligonukleotid zu der notwendigen Erhöhung der lokalen Konzentration an reaktiven Gruppen. In Anwesenheit stöchiometrischer Mengen Ziel-DNA war die Transferreaktion nach gut einer Stunde Reaktionszeit vollständig.<sup>[98]</sup> Seitz *et al.* berichteten bereits eine Vielzahl von Reportermolekülen, die mit dieser Methode übertragen werden kann. So wurde der Transfer von Fluorophoren,<sup>[99]</sup> einem Fluoreszenzlöcher,<sup>[98]</sup> Biotin<sup>[100]</sup> und sogar ganzer Peptide<sup>[103-104]</sup> untersucht. Die Reportervielfalt und hohe Geschwindigkeit machen den Templat-kontrollierten Acyltransfer zu einer attraktiven chemischen Reaktion für die Proteinmarkierung.

### 4.2.1 Test des Grundprinzips des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers

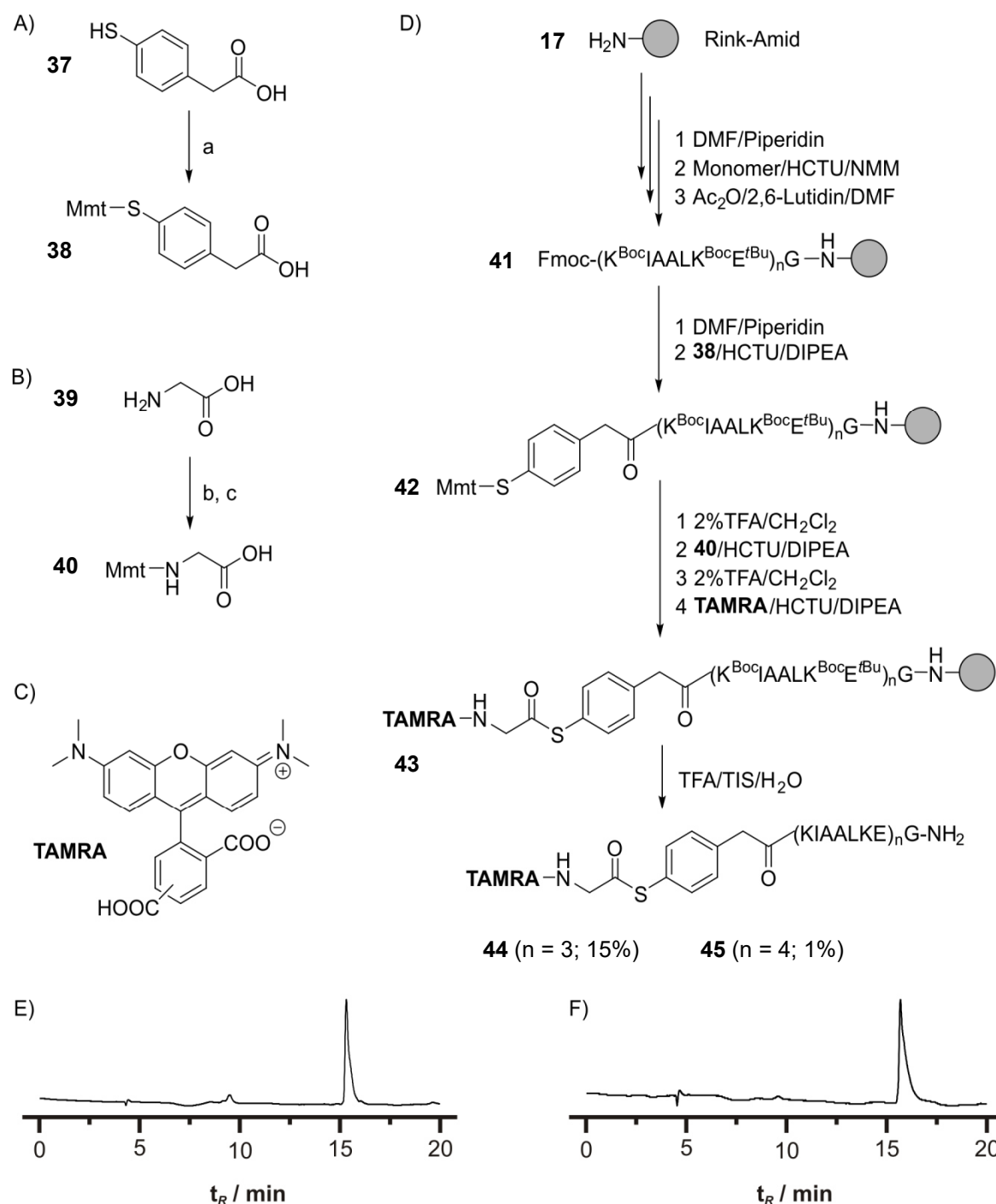
Der Peptidtemplat-vermittelte Transfer einer Reportergruppe **R** und der Mechanismus des Cystein-medierten Acyltransfers sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Das E-Coil wird genetisch mit dem Zielprotein fusioniert und trägt ein N-terminales Cystein (**7**). Um eine mögliche Homodimerisierung bei höheren Expressionsniveaus des POIs zu vermeiden und um den Massenzuwachs am Zielprotein zu minimieren, wurde das E3-Peptid statt des E4-Peptids als Erkennungssequenz gewählt. In dem Donorkonjugat **31** ist **R** an den N-Terminus des K3-Peptids als Thioester gebunden. Die Bildung des E/K-Coiled-Coils bringt das Cystein des E3-Peptids **7** in die räumliche Nähe der Acylgruppe und löst so einen Thiolaustausch aus. Diese Reaktion ist prinzipiell reversibel. Der anschließende S→N-Acyltransfer im Thioesterintermediat **33** fängt die Reportergruppe **R** jedoch kovalent als Amid im Transferprodukt **36** ab. Anders als bei der ursprünglich von Kent *et al.* entwickelten nativen chemischen Ligation<sup>[93]</sup> kommt es hierbei zu keiner Verknüpfung der beiden Peptide, sodass der Massenzuwachs am Zielprotein gering bleibt.



**Abbildung 4.9:** Schematische Darstellung der Proteinmarkierung durch den Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfer einer Reportergruppe **R** nach dem Mechanismus der NCL (**X** = Thiolkomponente).

Für die einfache Variation von sowohl **R**, der Reportergruppe, als auch **X**, der Thiolkomponente, wurde ein modulares Syntheschema für die Überträgersonden **31** bzw. **32** entwickelt. Die Darstellung der Thioesterpeptide durch Boc-Strategie gelang nicht. Nach dem Abspalten vom Harz durch die Behandlung mit TFA/TFMSA/*m*Cresol wurden hauptsächlich Peptide isoliert, deren Masse 18 Da oder 36 Da zu klein war und bei denen es sich höchstwahrscheinlich um K3-Peptide mit kondensierten Seitenketten handelt. Stattdessen wurde für die Thioesterkonjugate eine Synthese nach Fmoc-Strategie entwickelt. Dabei werden alle Syntheseschritte an der festen Phase durchgeführt (Abb. 4.10D). Die reaktiven K3- und K4-Peptide wurden an einem Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker synthetisiert (**17**). Der Coil-Peptidstamm wurde aus Fmoc-geschützten Aminosäurebausteinen aufgebaut. Als Kupplungsreagenzien kamen HCTU und HOBt zum Einsatz. Am *N*-Terminus wurde *S*-Mmt-Mercaptophenyllessigsäure (MPAA, **38**) als Thiolkomponente eingeführt. Die Thiolfunktion wurde durch Behandlung mit 2% TFA in Dichlormethan freigesetzt. In Studien zur NCL wurde herausgefunden, dass Glycin als Acylkomponente

deutlich schneller reagiert als z.B. Alanin- oder  $\beta$ -Alanin-Thioester. Aus diesem Grund wurde die Thioesterbindung mit *N*-Mmt-Glycin (**40**) geknüpft. Nach der Entfernung der Mmt-Gruppe wurde Konjugat **42** mit der Reportergruppe (5/6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA, Abb. 4.10C) über eine konventionelle Amidbindung beladen.

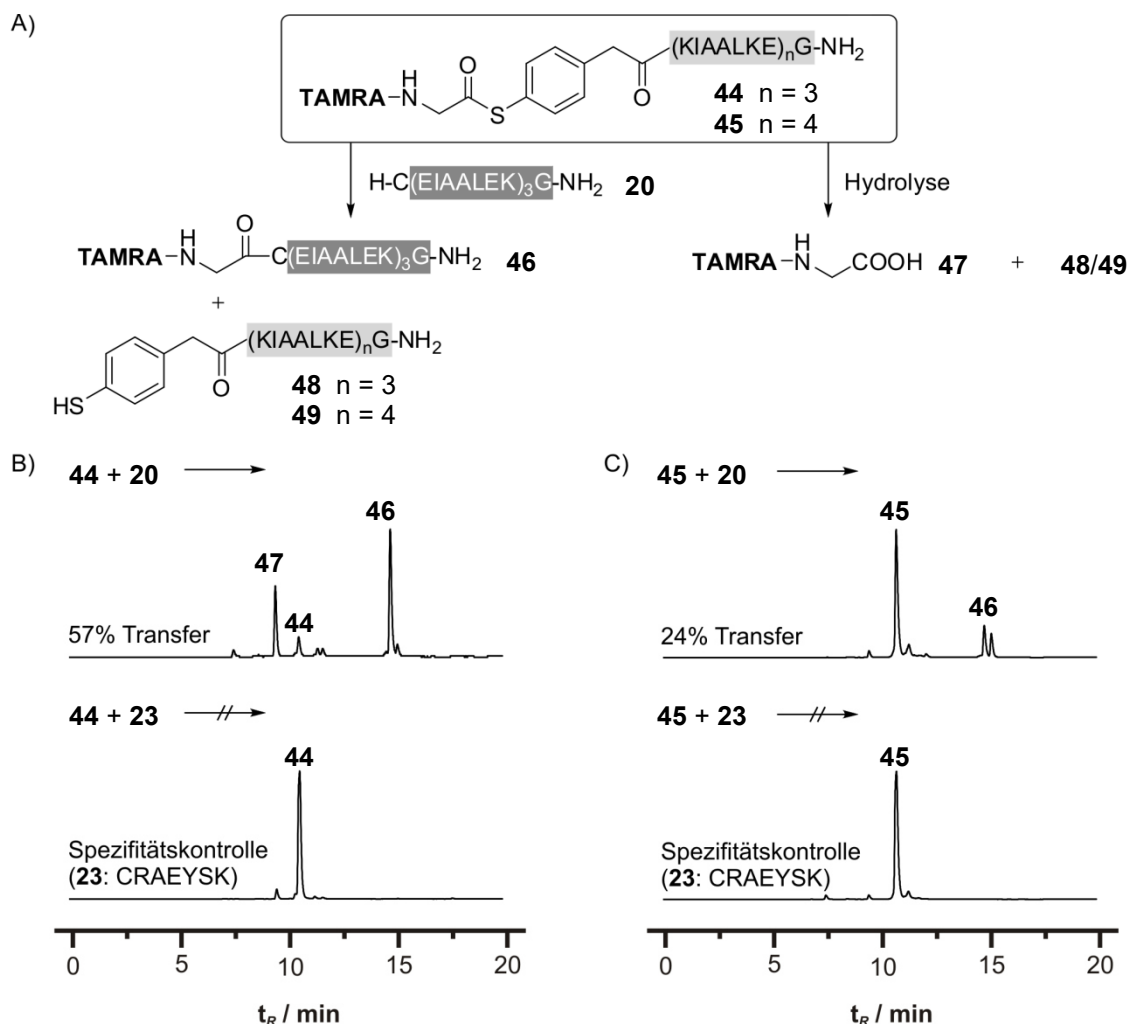


**Abbildung 4.10:** (A) Synthese von *S*-Mmt-Mercaptophenylacetic acid (MPAA, **38**), a) Mmt-Cl, DIPEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DMF, 1h, RT; (B) Synthese von *N*-Mmt-Glycin (**40**), b) TMS-Cl,  $\text{CHCl}_3$ , MeCN, 3h, Reflux, c) TEA, Mmt-Cl,  $\text{CHCl}_3$ , 10h, RT ; (C) Struktur von (5/6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA); (D) Festphasensynthese der MPAA-Thioesterpeptide **44** und **45**; Chromatogramme der Verbindung (E) **44** und (F) **45**.

Die abschließende Behandlung der Konjugate **43** mit TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (96:2:2) lieferte die gewünschten MPAA-Thioesterpeptide **44** und **45**, welche durch Umkehrphasenchromatographie gereinigt wurden. Die Synthese des Mmt-geschützten Bausteins **38** folgte einer Vorschrift von Barlos *et. al*<sup>[113]</sup> (Abb. 4.10A) und die von **40** einer Vorschrift von Maskill *et. al*<sup>[114]</sup> (Abb. 4.10B).

Für die Markierungsreaktion ist eine hohe gegenseitige Affinität der Templatpeptide förderlich. Beide Paare, E3/K3 und E3/K4, besitzen K<sub>D</sub>-Werte im nanomolaren Bereich. Um die Machbarkeit des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers zu überprüfen, wurden beide MPAA-Thioesterpeptidkonjugate **44** und **45** mit einem E3-Peptid mit N-terminalem Cystein (**20**, Abb. 4.11A) in 5 µM Konzentration in entgastem Phosphatpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7) zur Reaktion gebracht. Die Inkubation mit einem Cysteinylopeptid mit zufälliger Sequenz (**23**, H-CRAEYISK) diente als Selektivitätskontrolle. Nach 30 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 2vol% TFA gestoppt und der Transfer des Fluorophors TAMRA wurde mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC analysiert. Eine Markierung trat nicht auf, wenn die Thioesterpeptide **44** und **45** mit dem Kontroll-Cysteinylopeptid **23** inkubiert wurden (Spezifitätskontrolle, Abb. 4.11B und 4.11C). Im Gegensatz dazu ergab die Reaktion der K-Konjugate mit dem Cys-E3-Peptid neue fluoreszierende Produkte (Abb. 4.11B und 4.11C oben). Das Transferprodukt **46** trat durch die N- und S-Doppelacylierung als Doppelpeak auf. Ein Vergleich der HPLC-Spuren des K3- und K4-Thioesterpeptide machte signifikante Reaktivitätsunterschiede zwischen den Konjugaten deutlich. Die Reaktion zwischen den gleichlangen E3 und K3-Peptiden (**20** und **44**) lieferte 57% TAMRA-markiertes Produkt nach 30 min. Dahingegen wurden nur 24% Transferprodukt **46** erhalten, als Cys-E3 mit dem reaktiven TAMRA-K4 (**45**) umgesetzt wurde. Auf den ersten Blick sind diese Reaktivitätsunterschiede überraschend, da das K4-Peptid eine höhere Affinität für E3 besitzt als das K3-Konjugat. Unter den gewählten Bedingungen scheint die Coiled-Coil-Bildung jedoch nicht geschwindigkeitsbestimmend zu sein. Vielmehr könnte die Struktur des Coiled-Coil-Komplexes einen Einfluss auf die Transferreaktion nehmen. Im E3/K3-Paar wird die höchste Stabilität erreicht, wenn alle Heptadeinheiten am Coiled-Coil beteiligt sind. Dies führt zu einem Komplex mit stumpfen Enden, in dem die effektive molare Konzentration der reaktiven Gruppen am N-Terminus hoch ist. Im Gegensatz dazu ist die Struktur des E3/K4-Paar weniger definiert. Ist die N-terminale Heptadeinheit von K4 nicht

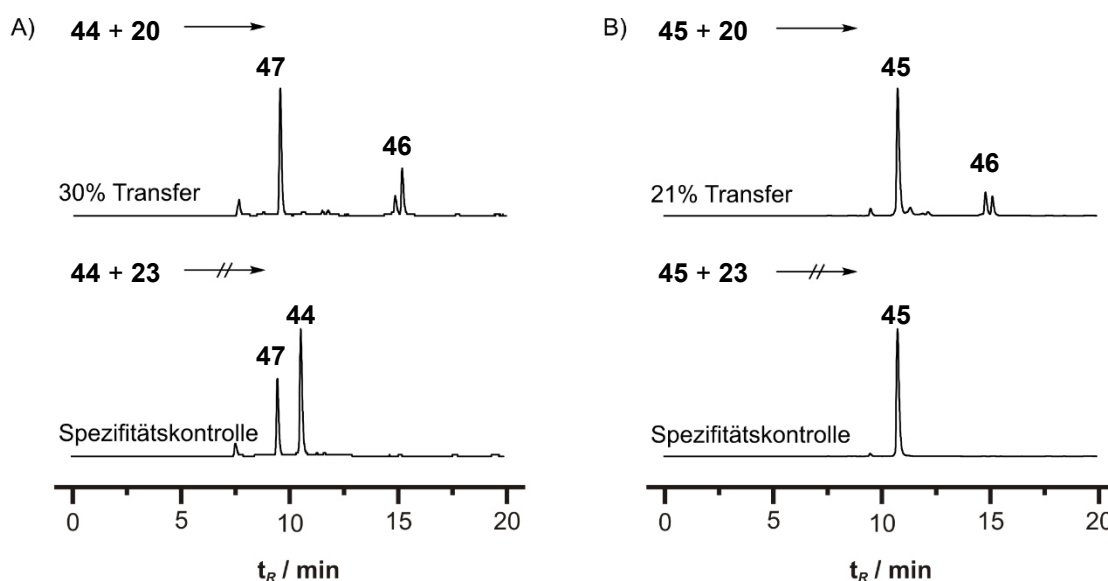
am Coiled-Coil beteiligt, würde dieser Versatz die effektive Molarität der *N*-terminalen Gruppen herabsetzen. Entsprechend wäre auch die Templat-vermittelte Reaktionsbeschleunigung geringer.



**Abbildung 4.11:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen den Thioester-K-Peptiden **44/45** und dem Cysteinyl-E3-Peptid **20** bzw. dem Cysteinylpeptid **23** (= Spezifitätskontrolle). (B) FLD-HPLC-Analyse nach 30 min Reaktion zwischen **44** und **20** (oben) oder **44** und **23** (unten). (C) FLD-HPLC-Analyse nach 30 min Reaktion zwischen **45** und **20** (oben) oder **45** und **23** (unten). Bedingungen: 5  $\mu$ M Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm.

Nachdem das Grundprinzip des Nukleinsäure-vermittelten Acyltransfers auf ein Peptidtemplat übertragen wurde, war es nun das Ziel, die Bedingungen zu untersuchen, die für eine Anwendung der Reaktion in der Proteinmarkierung attraktiv sind. Dafür wurde Phosphatpuffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP) entgast und auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt. Wässrige Stammlösungen der Thioester-K3/4- und des Cys-E3-Peptide wurden in Puffer gelöst, sodass in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L eine Endkonzen-

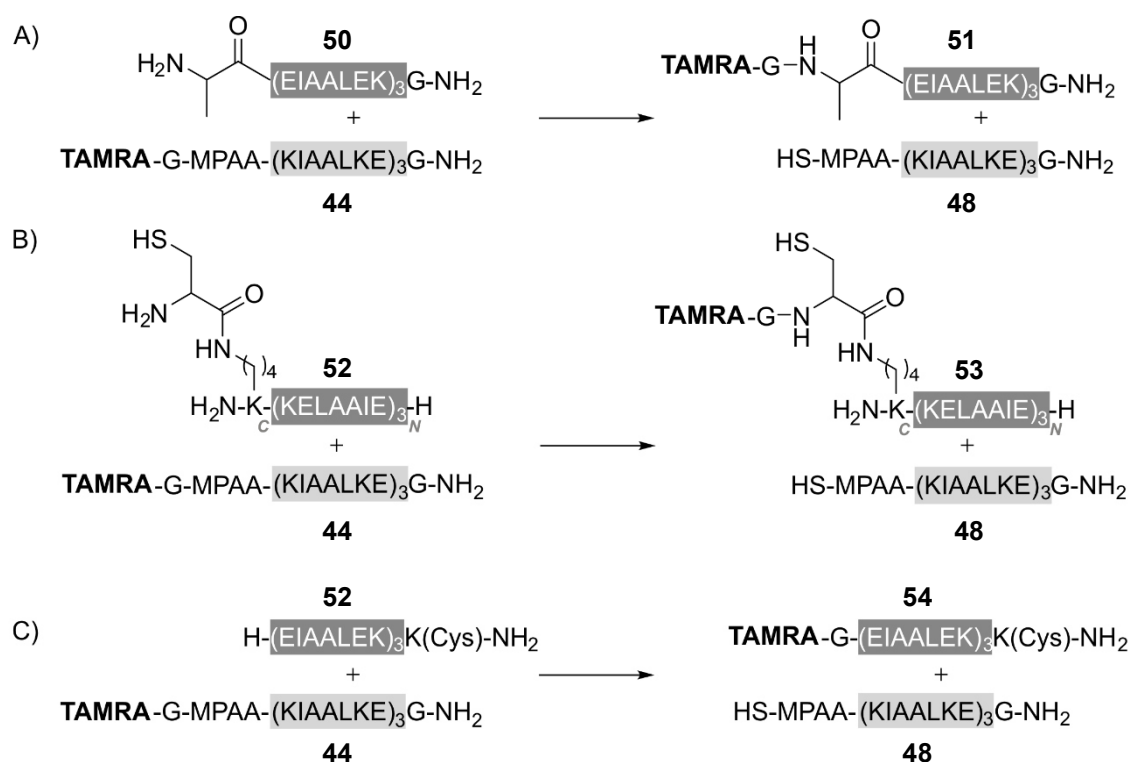
tration von 500 nM erreicht wurde. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurde die Reaktion durch TFA-Zugabe gestoppt. Bei diesen Konzentrationen zeigte die HPLC-Analyse mit Fluoreszenzdetektor die komplette Umsetzung des TAMRA-K3-Peptids **44** zum Hydrolyseprodukt **47** und zum Transferprodukt **46** (Abb. 4.12A, oben). Basierend auf den Flächenintensitäten der beobachteten Peaks entspricht dies einer Transferausbeute von 30% nach 30 min Reaktionszeit. Die Reaktion des TAMRA-K4-Peptids **45** mit **20** lieferte 21% Markierungsausbeute innerhalb dieser Zeit (Abb. 4.12B, oben). In beiden Fällen trat das Transferprodukt **46** wieder als Doppelpeak auf. Die Abwesenheit von Markierungsprodukt bei der Inkubation beider Thioester mit dem Kontroll-Cysteinylopeptid **23** zeigt, dass die Reaktion nur bei Ausbildung des Coiled-Coil-Motivs und der damit einhergehenden lokalen Konzentrationserhöhung stattfindet (Abb. 4.13A und B, unten). Basierend auf den höheren Transferausbeuten wurden für die weiteren Untersuchungen des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers die Kombination aus E3- und K3-Peptid gewählt.



**Abbildung 4.12:** FLD-HPLC-Analyse nach 30 min Reaktion zwischen (A) dem K3-Thioester **44** und **20** (oben) oder **44** und **23** (unten) bzw. (B) dem K4-Thioester **45** und **20** (oben) oder **45** und **23** (unten). Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}}$  = 555 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$  = 584 nm.

Es wurde nun untersucht, inwiefern die Acyltransferreaktion vom Cystein-vermittelten Thiolaustausch profitiert. Ein E3-Peptid, bei dem das Cystein durch ein Alanin ausgetauscht ist, wäre bei Ausbildung des E3/K3-Coiled-Coils immer noch in der Lage, den Thioester durch direkte Aminolyse nukleophil anzugreifen. Die Reportergruppe wird dabei kovalent auf die  $\alpha$ -Aminofunktion des E3-Peptids zu übertragen (Abb. 4.13A). Im Gegensatz zum

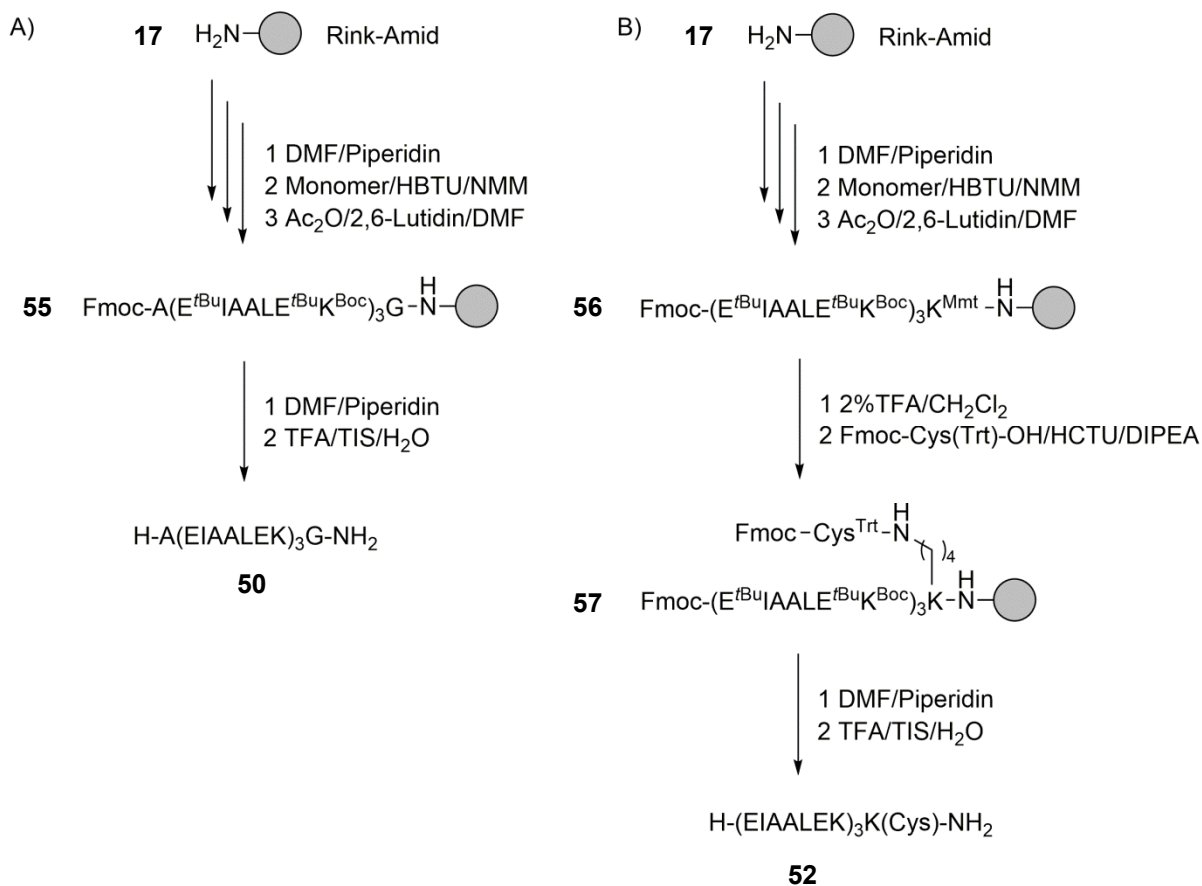
Cystein kann Alanin nicht doppelt acyliert werden, sodass das Transferprodukt im Chromatogramm als Einfachpeak detektiert wird. Als eine weitere Kontrolle sollte untersucht werden, ob ein E3-Peptid mit C-terminalem Cystein in der Lage ist, einer Peptidtemplat-vermittelten Acyltransferreaktion zu unterlaufen. Neben dem Acyltransfer der Reportergruppe durch direkte Aminolyse (Abb. 4.13C), könnte dies durch die teilweise antiparallele Anordnung des E3/K3-Coiled-Coils der Fall sein (Abb. 4.13B). Im Falle der Cystein-vermittelten Markierung des Peptids H-(EIAALEK)<sub>3</sub>K(Cys)-NH<sub>2</sub> **52** sollte das Transferprodukt sowohl N- als auch S-acyliert werden und im Chromatogramm als Doppelpeak detektiert werden.



**Abbildung 4.13:** Peptidtemplat-vermittelter Acyltransfer (A) ohne Cystein, (B) mit antiparallelem Coiled-Coil und (C) parallelem Coiled-Coil ohne N-terminales Cystein.

Die Synthese der beiden Kontroll-Akzeptorpeptide erfolgte an Rink-Amid-Linker beladenem Tentagel-Harz (**17**, Abb. 4.14). Für die Alanin-Mutante des E3-Peptids wurde der Aufbau Aminosäuresequenz mittels automatisierter Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie durchgeführt (**55**, Abb. 4.14A). Nach der Freisetzung der  $\alpha$ -Aminofunktion wurden die Seitenkettenschutzgruppen durch Behandlung mit TFA entfernt und das Produkt **50** vom Harz freigesetzt. Für das E3-Peptid mit C-terminalem Cystein wurde im ersten Schritt Fmoc-Lys(Mmt)-OH an das Harz gebunden (Abb. 4.14B). Anschließend

erfolgte die Synthese des E3-Peptidstammes durch automatisierte Synthese. Nach der Entfernung der Mmt-Schutzgruppe wurde an die  $\epsilon$ -Aminofunktion des Lysins ein Fmoc-geschützter Cysteinbaustein gekuppelt. Durch die Behandlung mit DMF/Piperidin wurden erst die beiden  $\alpha$ -Aminofunktionen entschützt und anschließend durch TFA die Seitenkettenschutzgruppen von **57** entfernt und das Produkt **52** vom Harz abgespalten.

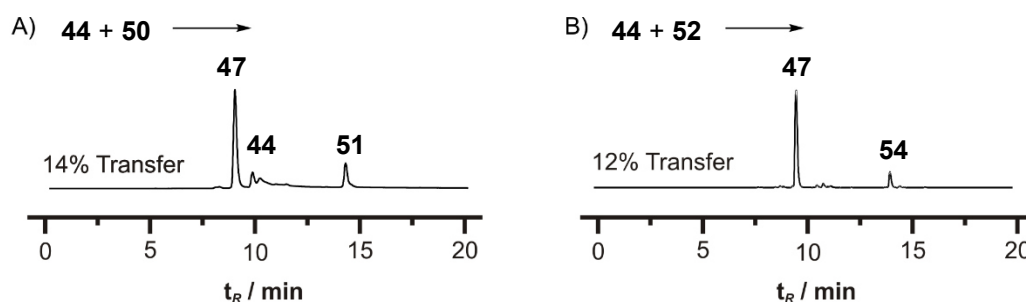


**Abbildung 4.14:** Festphasensynthese der Kontroll-E3-Peptide **50** und **52**.

Die Verfolgung des Acyltransfers erfolgte mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC. Dafür wurden die Peptide in 500 nM Konzentration in Phosphatpuffer zur Reaktion gebracht. Für die Umsetzung des TAMRA-K3-Thioesters **44** mit dem E3-Peptid mit C-terminalem Cystein **52** enthielt der Puffer zudem 1 mM TCEP zur Reduktion eventuell vorhandener Disulfide. Bei der Reaktion zwischen dem Ala-E3-Peptid **50** und dem K3-Thioester **44** wurde nach 20 min Reaktion eine Transferausbeute von 14% beobachtet (Abb. 4.15A). Die Bildung des E3/K3-Coiled-Coils ermöglicht also auch die direkte Aminolyse des Thioesters. Die Ausbeuten sind jedoch geringer als bei der Umsetzung mit dem Cystein-tragenden E3 **20** (30%, Vgl. Abb. 4.12A oben). Bei der Inkubation des K3-Thioesters **44** mit dem E3-Konjugat



**52** könnte es beim teilweisen Vorliegen eines antiparallelen Coiled-Coil-Motivs zur Cystein-vermittelten Bildung des Transferprodukts **53** kommen. Darüber hinaus ermöglicht die parallele Orientierung beider Peptidstränge die direkte Aminolyse des Thioester und die Bildung des Produkts **54** (Abb. 4.13C). Sollten sich diese antiparallelen Coiled-Coil-Motive also ausbilden, wäre das Auftreten von mehreren neuen Signalen für die verschiedenen Produkte zu erwarten. Das Chromatogramm nach 30 min Reaktionszeit weist neben dem Signal für das Hydrolyseprodukt **47** nur ein weiteres Signal für Verbindung **54** auf, welche als einfacher und nicht als Doppelpeak auftritt (Abb. 4.15B). Bezogen auf die Flächeninhalte aller Peaks entspricht dies einer Transferausbeute von 12%, was vergleichbar ist mit dem Acyltransfer des Ala-E3-Konjugats **50**. Die Ausbildung antiparalleler Coiled-Coil-Motive scheint bei dem E3/K3-Peptidpaar keine Rolle zu spielen. Die definierte, parallele Anordnung der Peptide macht sie zu geeigneten Templaten für die Acyltransferreaktion

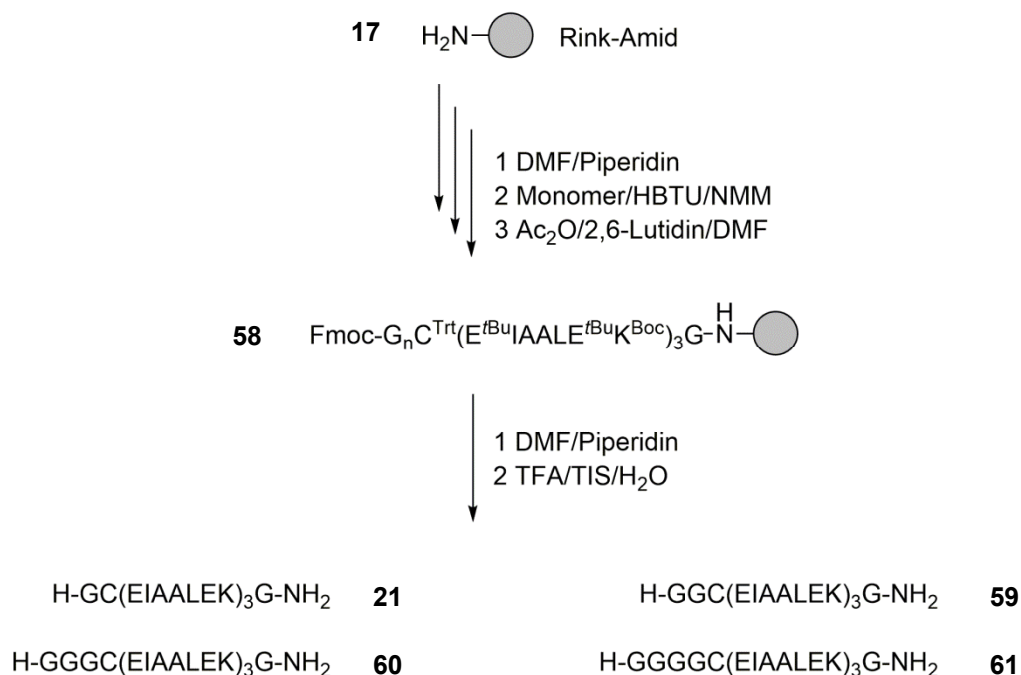


**Abbildung 4.15:** Peptidtemplat-vermittelte Acyltransfer zwischen dem TAMRA-K3-Thioester **44** und (A) dem Ala-E3-Peptid **50** bzw. (B) dem E3-Peptid mit C-terminalem Cystein **52**; Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , (1 mM TCEP bei Reaktion mit **52**), pH 7, RT,  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm.

#### 4.2.2 Optimierung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers

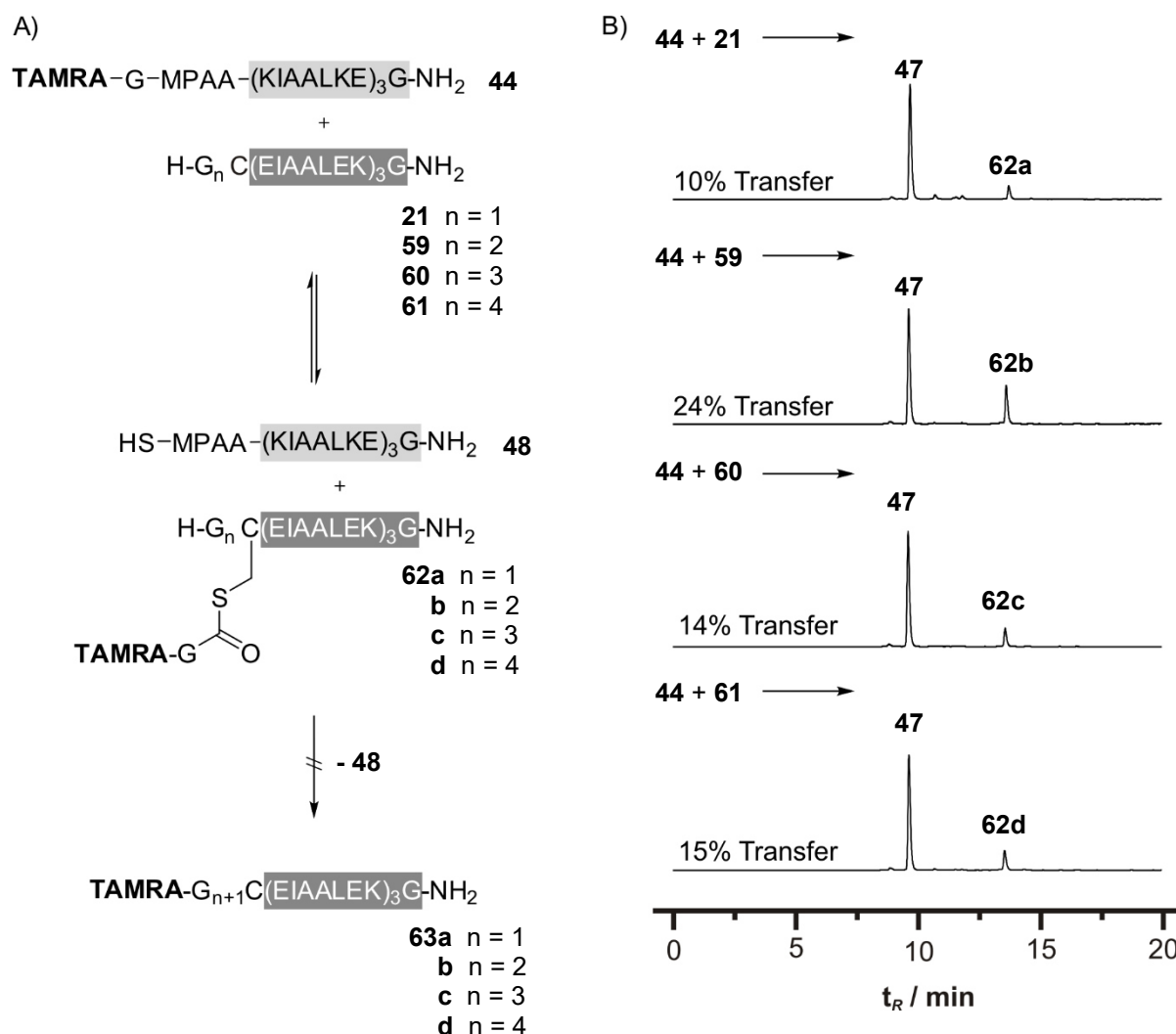
Aus Studien zur nativen chemischen Ligation ist bekannt, dass auch interne Cysteine in der Lage sind, die Ligationsgeschwindigkeit zu erhöhen.<sup>[115]</sup> Nach dem Thiolaustausch findet der S-N-Acyltransfer dabei nicht über einen 5-gliedrigen Übergangszustand statt, sondern über einen Makrozyklus. Die Acyltransferreaktion mit internen Cysteinen ist besonders für Markierungsexperimente mit bakteriellen Proteinen interessant, da diese die Proteinbiosynthese stets mit einem Methionin beginnen. Es wurden deshalb Cysteiny1-E3-Peptide mit unterschiedlich vielen N-terminalen Glycinen dargestellt, um zugleich ein

Abstandsscreening durchzuführen. Die Peptide **21** und **59 - 61** wurden am Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker (**17**, Abb. 4.16) synthetisiert. Der Aufbau der Aminosäuresequenz erfolgte mittels Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie. Nach dem Freisetzen der  $\alpha$ -Aminofunktion der Verbindungen **58** wurden durch Behandlung mit TFA die Seitenkettenschutzgruppen entfernt und die Produkte **21** und **59 - 61** vom Harz abgespalten.



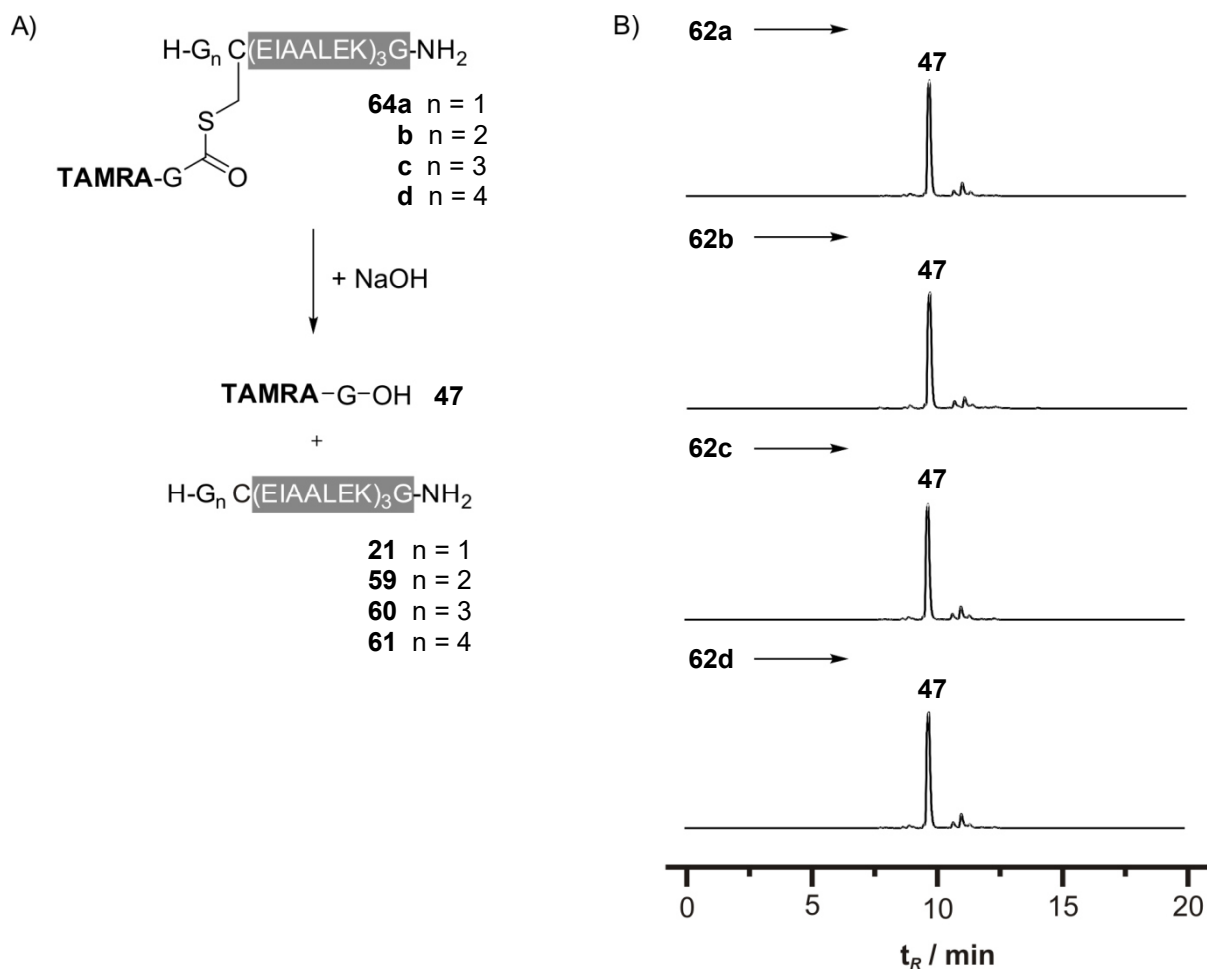
**Abbildung 4.16:** Festphasensynthese der internen Cysteinylpeptide **21** und **59 - 61**.

Für die Reaktion aller internen Cysteinylpeptide **21** und **59 - 61** mit dem TAMRA-K3-Konjugat **44** wurden die Ausbeuten des Transfers nach 30 min mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC bestimmt. Bei einer Konzentration von 500 nM Thioesterpeptid kam es mit jedem der Cysteinylpeptide ( $c = 500$  nM) zum Auftreten jeweils eines neuen fluoreszierenden Produktes mit einer Retentionszeit von 13.6 min, welche als Einfachpeak erschienen, und des Hydrolyseprodukts **47** (vgl. Abb. 4.11A). Abbildung 4.17B zeigt die Chromatogramme der Reaktionen. Die höchste Transferausbeute von 24% wurde dabei mit dem E3-Peptid **59** erreicht, bei dem das Cystein zwei Aminosäuren entfernt ist vom *N*-Terminus. Ein Vergleich mit der Retentionszeit des Transferprodukts **46** ( $t_R = 14.8/15.2$  min, Doppelpeak, vgl. Abb. 4.12A) zeigt jedoch, dass es sich dabei um die Thioesterintermediate **62 a-d** handelt, welche sich innerhalb der 30 min Reaktionszeit noch nicht zu den Produkten **63 a-d** umgelagert haben (Abb. 4.17A).



**Abbildung 4.17:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen dem Thioester-K3-Peptid und den internen Cysteinyll-E3-Peptiden. (B) FLD-HPLC-Analyse nach 30 min Reaktion zwischen **44** und **21** bzw. **59** - **61**. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm.

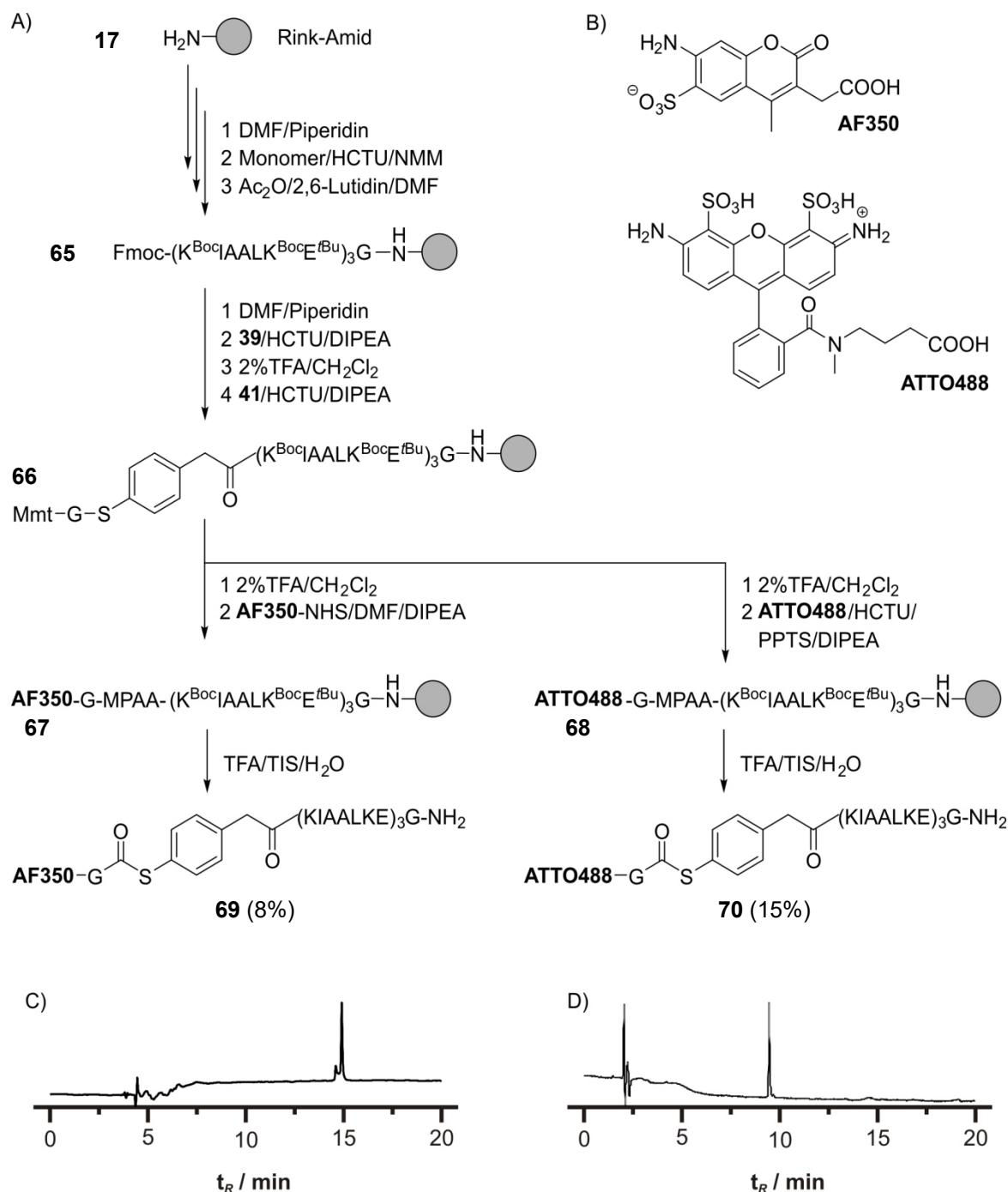
Eine Behandlung der Proben mit Base (2vol% 6M NaOH) führte zu einem Verschwinden der Transferprodukt-Peaks (Abb. 4.18). Auch in den Ligationsstudien von Seitz *et al.* wurde nach einer Reaktionszeit von 8 h neben den Ligationsprodukten noch nicht-umgelagertes Intermediat gefunden.<sup>[115]</sup> Die S-N-Acylwanderung über einen Makrozyklus in den internen Cysteinyllpeptiden **21** und **59** - **61** scheint bedeutend langsamer zu sein als die Umlagerung über einen Fünfring wie in dem terminalen Cys-E3-Peptid **20**. Auch nach einer einstündigen Reaktionszeit war keine Bildung der Transferprodukte **63a-d** zu beobachten (siehe Anhang, Abb. 9.1).



**Abbildung 4.18:** (A) Basische Behandlung des Reaktionsprodukts des Acyltransfers zwischen dem Thioester-K3-Peptid **44** und den internen Cysteinyl-E3-Peptiden **21** bzw. **59** - **61**. (B) FLD-HPLC-Analyse nach 60 min Reaktionszeit und der Zugabe von 2vol% 6M NaOH; Proben wurden neutralisiert vor der Analyse. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 584 \text{ nm}$ .

## Erweiterung des Farbrepertoires

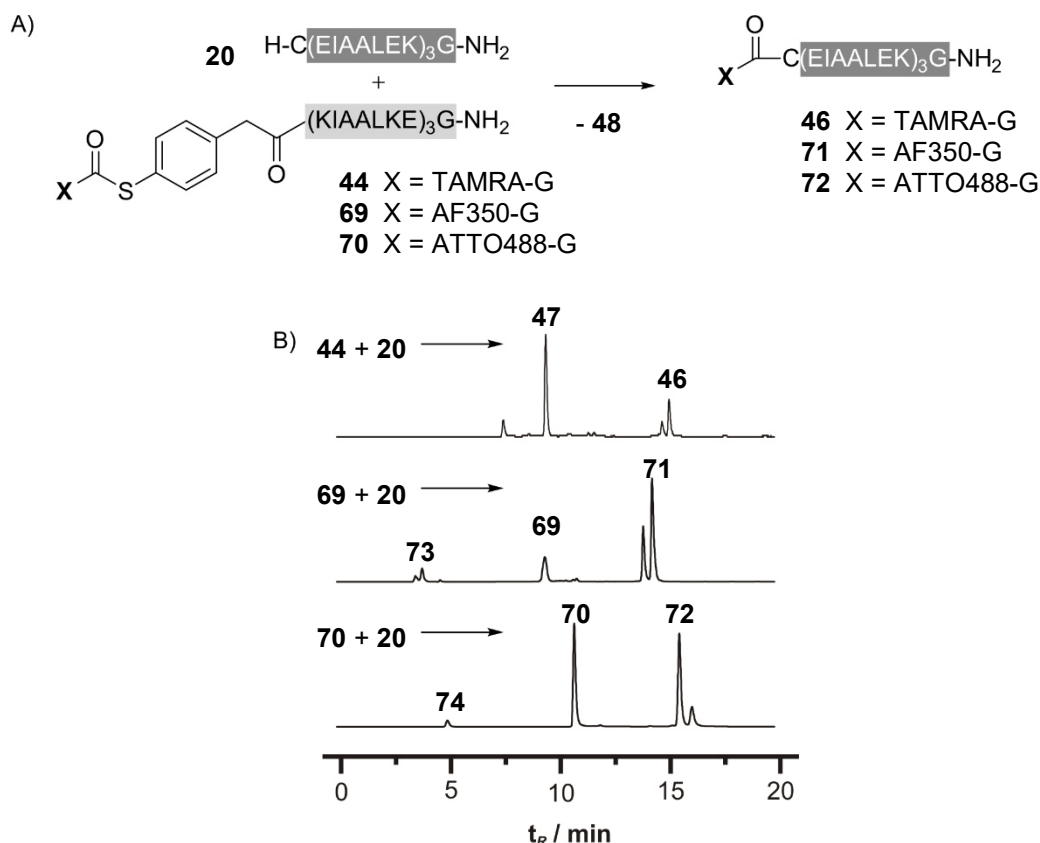
Im nächsten Schritt sollte das Farbspektrum der Donorkonjugate vom roten in den grünen und blauen Bereich erweitert werden. Durch das modulare Syntheschema ist die Variation der Reportergruppe besonders einfach. Nach der automatisierten Synthese des K3-Peptidstammes am Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker wird MPAA als Mmt-geschützter Baustein **38** manuell an den Vorläufer **66** gekuppelt (Abb. 4.19A). Nach der Kupplung von *N*-Mmt-Glycin (**40**) erfolgte die Aliquotierung des Harzes. Als Farbstoff für den grünen Bereich wurde der ATTO488-Fluorophor (**ATTO488**, Abb. 4.19B) gewählt, der als Carbonsäure mit aliphatischem Linker erworben wurde, und für den blauen Bereich Alexafluor 350 (**AF350**, Abb. 4.19B), welcher als NHS-Ester bezogen wurde. Nach dem Entschützen der  $\alpha$ -Aminofunktion wurde ATTO488 gekuppelt.



**Abbildung 4.19:** (A) Festphasensynthese der Thioesterpeptide **69** und **70**. (B) Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe **AF350** und **ATTO488**; Chromatogramme der Verbindungen (C) **69** und (D) **70**.

Neben HCTU und DIPEA wurde dazu auch Pyridinium-*para*-toluensulfonat (PPTS) benötigt, um eine ausreichende Löslichkeit des Farbstoffes in DMF zu erreichen. Die Anbindung von AF350 erfolgte ohne Zugabe eines weiteren Aktivators in DMF mit DIPEA als Base. Die abschließende Behandlung mit TFA führte zur Entfernung der Schutzgruppen und der Freisetzung der Produkte **69** und **70**. Die Peptidthioester mit den verschiedenen Farbstoffen wurden dann mit dem Cys-E3-Peptid **20** und der Selektivitätskontrolle **23** in

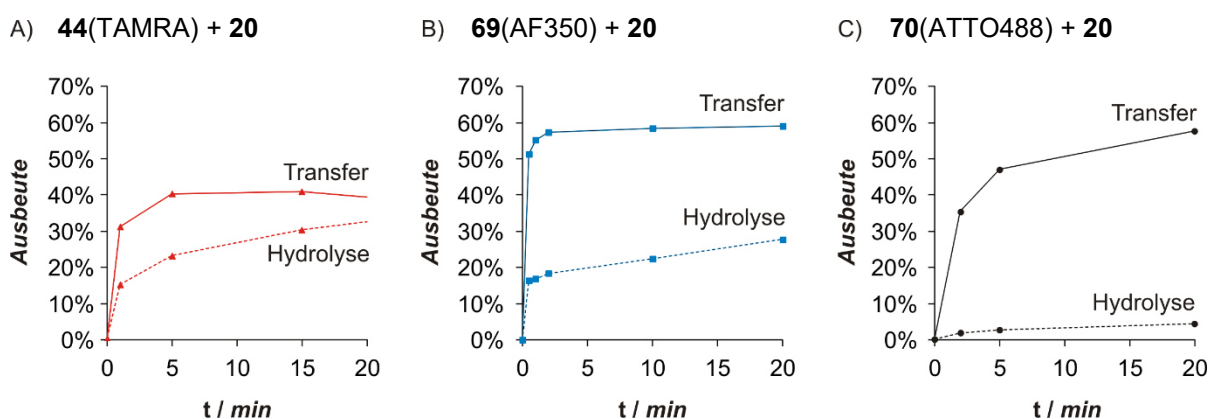
Phosphatpuffer bei einer Konzentration von 500 nM zur Reaktion gebracht. Die Analyse des Acyltransfers erfolgte mithilfe der Fluoreszenz-detektierten HPLC. Die Inkubation mit dem Cysteinylpeptid **23** führte zu keiner Transferreaktion (vgl. Abb. 9.2 Anhang). In Abbildung 4.20B sind exemplarisch die Chromatogramme der Reaktionen der Thioester mit dem Cys-E3-Konjugat **20** nach 10 min Reaktionszeit abgebildet.



**Abbildung 4.20:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen den Thioester-K3-Peptiden **44** (TAMRA), **69** (AF350) und **70** (ATTO488) und dem Cys-E3-Peptid **20**. (B) FLD-HPLC-Analyse nach 10 min Reaktionszeit. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT; TAMRA:  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm; AF350:  $\lambda_{\text{Ex}} = 346$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 442$  nm; ATTO488:  $\lambda_{\text{Ex}} = 501$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 523$  nm.

Es ist sowohl die Bildung der Transferprodukte (**46**, **71** bzw. **72**) zu erkennen als auch das Auftreten der fluoreszierenden Hydrolyseprodukte (**47**, **73** bzw. **74**). Über den Zeitraum von 20 min wurden den Reaktionslösungen Aliquote entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 2vol% TFA gestoppt. Der zeitliche Verlauf der Transferausbeuten ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Unter diesen Bedingungen benötigte der Transfer mit dem ATTO488-Thioester (**70**) 10 min um eine Transferausbeute von 50% zu erreichen (—, Abb. 4.21C). Dahingegen lieferte die Reaktion mit dem AF350-Thioester (**69**) 58% Transferausbeute nach nur 2 min (—, Abb. 4.21B). Auch die Reaktion mit dem TAMRA-

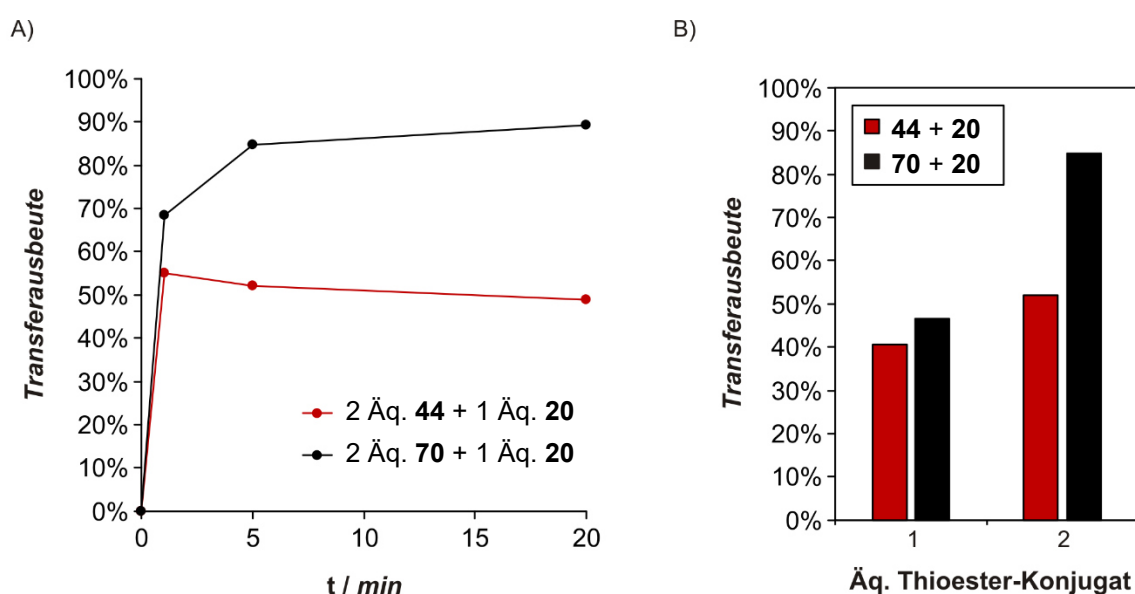
Thioester (**44**) zeigte eine hohe Anfangsgeschwindigkeit, erreichte jedoch ein Plateau von 41% Transferausbeute nach 5 min Reaktionszeit (—, Abb. 4.21A). Die HPLC-Analyse der Reaktionen zeigte auch auf, dass die konkurrierende Hydrolysereaktion die Transferausbeute limitiert. Dieser Effekt war für die Transferreaktion mit dem TAMRA-Thioester **44** (---) und dem AF350-Thioester **69** (----) stärker ausgeprägt als für die Reaktion des ATTO488-Konjugats **70** (-----). Offensichtlich hat die Struktur der Reportergruppe einen Einfluss auf die Reaktivität der Thioesterbindung. Die Gründe dieser signifikanten Reaktivitätsunterschiede wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter beleuchtet. Jedoch ist festzuhalten, dass von den drei untersuchten Farbstoffen ATTO488 über die längste Alkylkette angebunden war.



**Abbildung 4.21:** Zeitlicher Verlauf der Transfer- und Hydrolysereaktion während der Markierungsreaktion des Cys-E3-Peptids **20** mit (A) dem TAMRA-K3-Thioester **44**, (B) dem AF350-K3-Thioester **69** und (C) dem ATTO488-K3-Thioester **70**. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT.

Die schnelle Hydrolyse des Markierungsagenz ist bei der Anwendung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers in Lebendzelleexperimenten kein Nachteil. Für die hier beschriebenen Experimente in Phosphatpuffer wurden bislang Thioester-Konjugate und Cysteinylopeptide in äquimolaren Mengen eingesetzt. In Markierungsexperimenten mit Proteinen in Zellmembranen werden die Zellen mit einem Überschuss an Donorkonjugat inkubiert. Die rasche Hydrolyse von überschüssigen Thioesterpeptiden reduziert dabei mögliche Hintergrundreaktionen. Durch den Einsatz von mehr Äquivalenten an Thioesterkonjugat wird zudem die maximal erreichbare Transferausbeute bezogen auf das Cysteiny-E3-Peptid gesteigert.

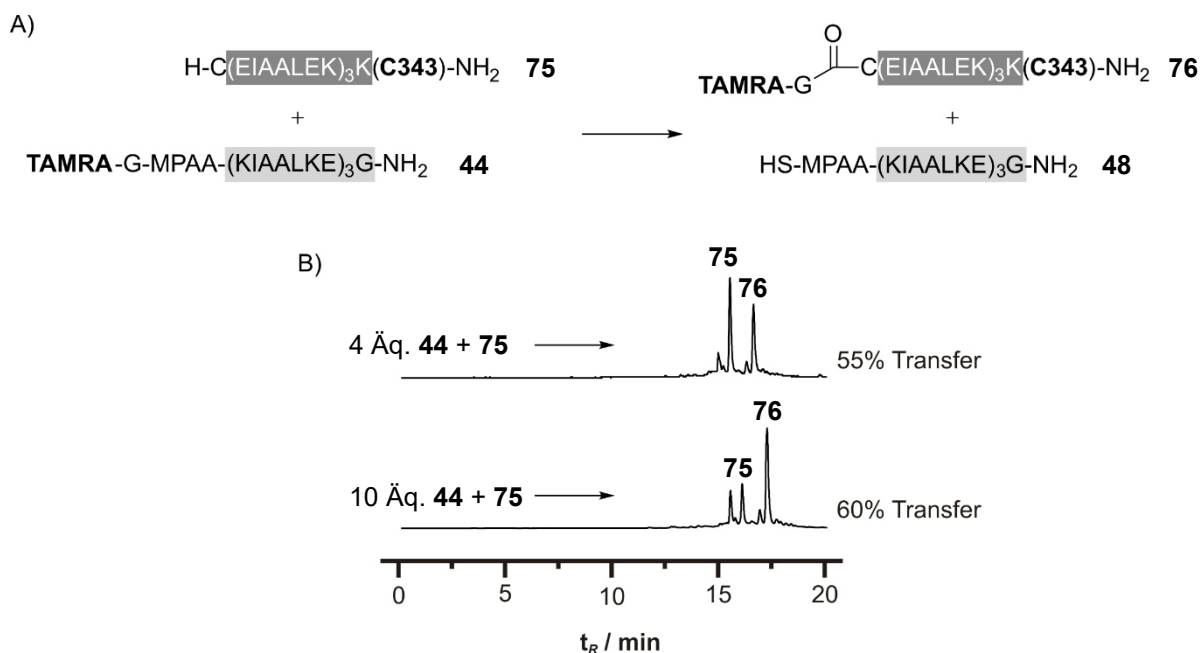
So liefert die Reaktion mit zwei Äquivalenten ATTO488-K3-Thioester **70** ( $c = 500$  nM) nach 5 min Inkubation mit dem Cys-E3-Peptid **20** ( $c = 250$  nM) eine Transferausbeute von 85% im Vergleich zu 47% bei der Verwendung äquimolarer Mengen (Abb. 4.22B). Dabei wurde die Gesamtpeptidkonzentration sogar herabgesetzt. Durch die sehr rasche Hydrolyse des TAMRA-K3-Thioesters **44** erreicht die Reaktion mit einem einfachen Überschuss an Donoragenz nach einer Minute ein Plateau von ca. 52% (—, Abb. 4.22A), sodass die Ausbeutesteigerung gering blieb in Bezug auf 41% Transferausbeute bei der Reaktion äquimolarer Mengen an Donor- und Akzeptorpeptid.



**Abbildung 4.22:** (A) Zeitlicher Verlauf der Transferausbeute während der Reaktion des Cys-E3-Peptids **20** mit 2 Äq. TAMRA-Thioester **44** oder ATTO488-Thioester **70**; (B) Transferausbeuten nach 5 min Reaktionszeit mit und ohne Überschuss an Thioester-Peptid; Bedingungen: 500 nM Thioesterpeptid, 250 nM bzw. 500 nM Cys-E3-Peptid, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT.

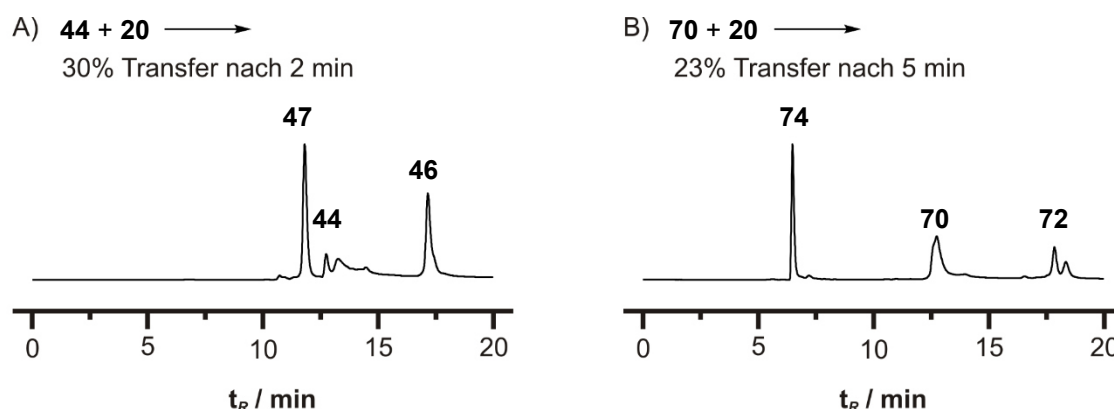
Wird für die Markierungsreaktion ein noch größerer Überschuss an TAMRA-K3-Thioester **44** eingesetzt, lässt sich die Ausbeute an Transferprodukt auf 60% steigern (Abb. 4.23B). Für dieses Experiment wurden zehn Äquivalente des Thioesterpeptids **44** ( $c = 5$   $\mu\text{M}$ ) mit einem Cys-E3-Peptid **75** ( $c = 500$  nM) inkubiert, das C-terminal ein Fluorophor gebunden hatte, welcher nicht mit dem Spektralbereich des TAMRA überlappt. Als zweiter Chromophor wurde Coumarin 343 gewählt, welcher als Amid über die  $\epsilon$ -Aminofunktion eines zusätzlichen Lysins an den C-Terminus von **75** gebunden wurde (Abb. 4.23A). Die Analyse der Transferreaktion erfolgte mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC bei den Anregungs- und Emissionswellenlängen von C343.





**Abbildung 4.23:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen Cys-E3(C343) **75** und verschiedenen Überschüssen an TAMRA-K3-Thioester **44**. (B) FLD-HPLC-Analyse mit 4 Äq. (oben) und 10 Äq. **44** nach 10 min Reaktionszeit. Bedingungen: 2  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  **44**, 500 nM **75**, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 426$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 489$  nm.

Eine gute Strategie für die Markierung von Proteinen in lebenden Zellen zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass es möglichst keine unselektiven Hintergrundmarkierungen gibt. Es ist deshalb erstrebenswert, eine möglichst geringe Konzentration an Markierungsagens in Lebendzellexperimenten einzusetzen. Aus diesem Grund sollte nun die Transferreaktion unter Bedingungen noch höherer Verdünnung untersucht werden. Hierfür wurden der TAMRA-K3-Thioester **44** bzw. der ATTO488-K3-Thioester **70** in einer Konzentration von nur 100 nM mit dem Cys-E3-Peptid **20** ( $c = 100$  nM) in Phosphatpuffer zur Reaktion gebracht. Für beide Reaktionen wurden die Ausbeuten des Acyltransfers nach 2 bzw. 5 min mittels FLD-HPLC bestimmt (Abb. 4.24). In beiden Fällen wurde das Auftreten eines Signals für das Transferprodukt beobachtet. So ergab die Reaktion des TAMRA-K3-Thioesters **44** eine Transferausbeute von 30% nach nur 2 min (Abb. 4.24A). Zudem wurden 40% Hydrolyseprodukt **47** detektiert. Mit dem ATTO488-K3-Thioester **70** wurde eine Transferausbeute von 23% detektiert sowie 36% Hydrolyseprodukt **74** (Abb. 4.24B).

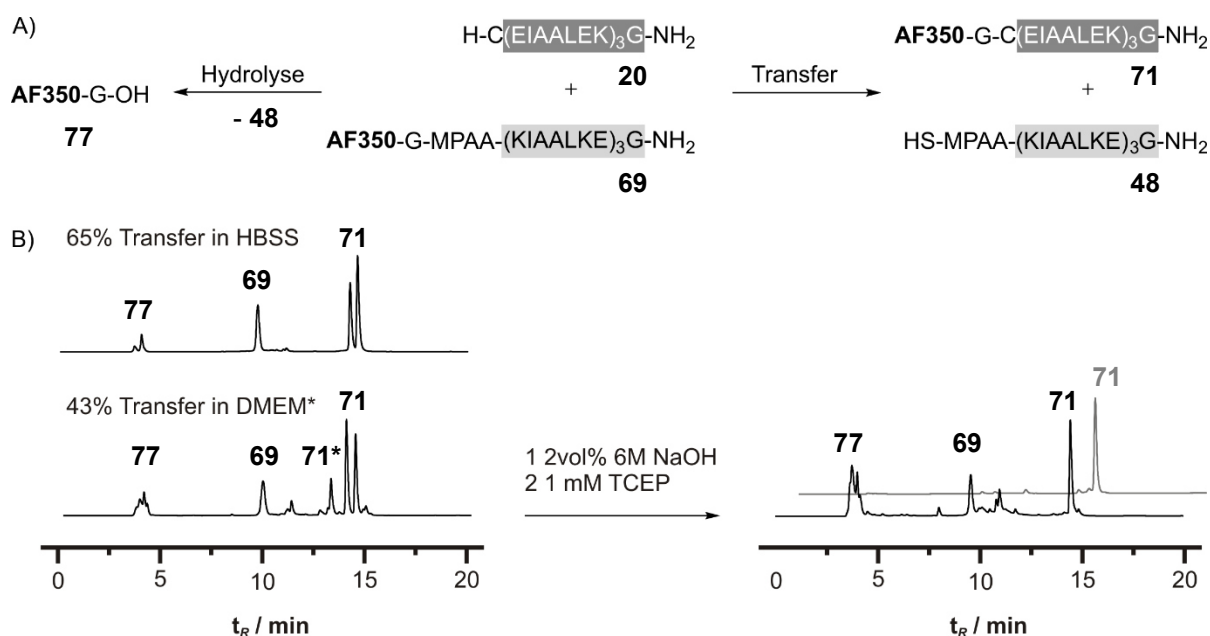


**Abbildung 4.24:** FLD-HPLC-Analyse der Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion bei 100 nM Peptidkonzentration zwischen dem Cys-E3-Peptid **20** und (A) dem TAMRA-K3-Thioester **44** nach 2 min bzw. (B) dem ATTO488-K3-Thioester **70** nach 5 min. Bedingungen: 100 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT; TAMRA:  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm; ATTO488:  $\lambda_{\text{Ex}} = 501$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 523$  nm.

Die Versuche zum Peptid-vermittelten Acyltransfer in Phosphatpuffer haben gezeigt, dass die Transferreaktion geeignet ist, auch bei niedrigen Reaktandenkonzentrationen selektiv verschiedene Reportergruppen zu übertragen. Um die Chemo-selektivität des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers einer strengeren Prüfung zu unterziehen, aber auch als Vorversuch für die ausstehenden Lebendzellexperimente wurde die Reaktion in zwei Zellkulturmedien durchgeführt. Das Medium HBSS (*Hank's balanced salt solution*) hat einen physiologischen pH-Wert von 7.4 und besteht aus anorganischen Salzen und Glucose (0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1g Glucose, 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ ). Das AF350-Thioesterpeptid **69** und das Cysteinyl-E3-Peptid **20** wurden in HBSS mit 1 mM TCEP in 500 nM Konzentration zur Reaktion gebracht. Die Fluoreszenz-detektierte HPLC-Analyse zeigte, dass unter diesen Bedingungen nach 20 min Reaktionszeit eine Transferausbeute von 68% erreicht wird (Abb. 4.25B, oben). Dies ist in der Größenordnung der erreichten Markierungsausbeute in Phosphatpuffer für dieses Thioesterpeptid. Weder eine höhere Salzkonzentration noch Glucose scheinen sich störend auf die Coiled-Coil-Bildung auszuwirken.

Für die Inkubation von lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum wird zumeist ein nährreicheres Medium wie z.B. DMEM\* verwendet. DMEM\* (*Dulbecco's modified Eagles medium*) enthält neben anorganischen Salzen noch einige Vitamine und Aminosäuren, u.a. 200  $\mu\text{M}$  Cystin, sowie 2vol% fetales Kälberserum (Zusammensetzung siehe Tabelle 9.1, S. 131). Damit ist die Zusammensetzung dieses Mediums nicht nur komplexer, sondern

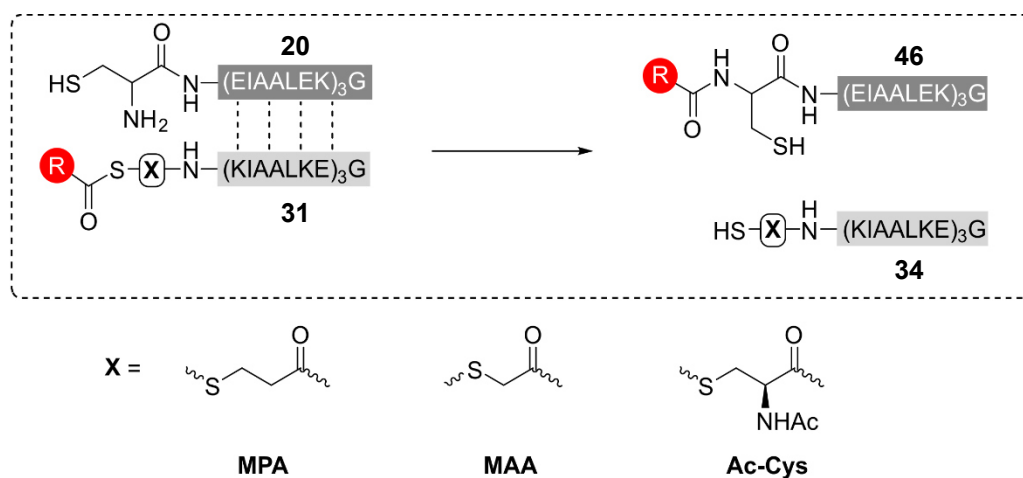
verhindert den Einsatz von TCEP als Reduktionsmittel für eventuell oxidiertes Cysteinylopeptid. Die Zugabe von den sonst verwendeten 1 mM TCEP zur Reaktionslösung würde das Cystin zu 400  $\mu$ M Cystein reduzieren, welches wiederum zur schnellen Thiolyse des Thioesterpeptids **69** führen würde. Aus diesem Grund wurde der Reaktion in DMEM\* kein Reduktionsmittel zugesetzt. Die HPLC-Analyse der Reaktion zwischen dem AF350-K3-Konjugat **69** und dem Cys-E3 **20** nach 20 min zeigte das Erscheinen von drei neuen Peaks (Abb. 4.25, unten links). Neben dem als Doppelpeak auftretenden Transferprodukt **71** handelt es sich um das oxidierte Transferprodukt **71\***, welches als Disulfid vorliegt. Die Behandlung der Probe mit 2vol% 6M NaOH verseift das doppeltacylierte Produkt zum einfachacylierten und eine anschließende TCEP-Zugabe reduziert **71\*** (Abb. 4.25, unten rechts). Die Retentionszeit des Transferproduktes ist identisch mit der des synthetischen AF350-C-E3-Konjugats **71** (graue Spur, Abb. 4.25 unten rechts). Bemerkenswerterweise lieferte die Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion auch in Abwesenheit eines externen Reduktionsmittels eine Ausbeute von 43% trotz der Anwesenheit von fetalem Kälberserum und Cystin.



**Abbildung 4.25:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen dem AF350-Thioester **69** und dem Cys-E3-Peptid **20**; (B) FLD-HPLC-Analyse nach 20 min in HBSS (oben) und in DMEM\* (unten). Bedingungen: 500 nM Peptide, HBSS: pH 7.4 + 1 mM TCEP, DMEM\*: pH 7.5;  $\lambda_{\text{Ex}} = 346$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 442$  nm.

## Einstellung der Reaktivität

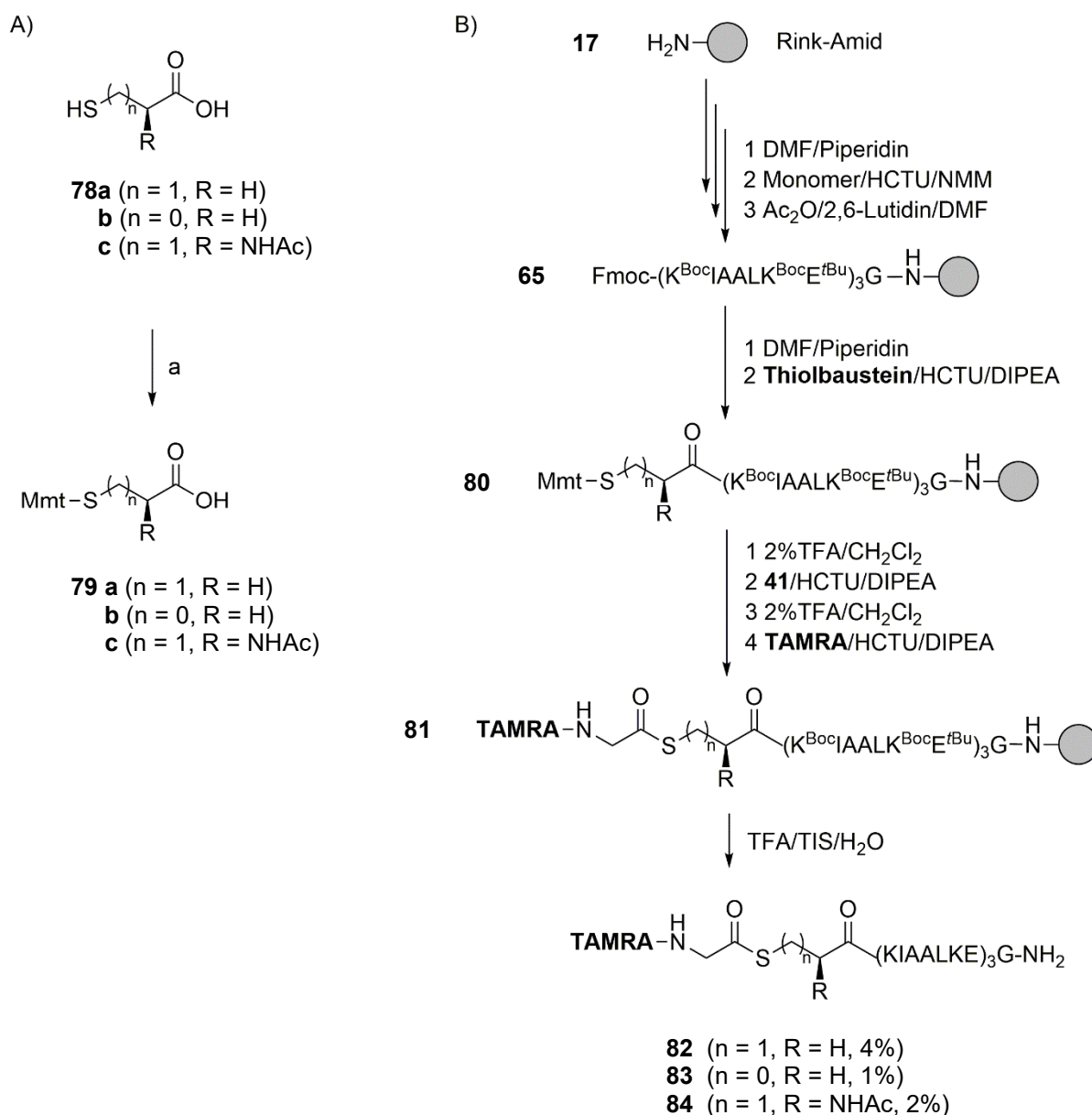
Die vergleichenden Transferstudien mit den TAMRA-, AF350- und ATTO488-Thioesterkonjugaten haben gezeigt, dass der TAMRA-K3-Thioester **44** in besonderem Maße von der Hydrolyse betroffen ist. Obwohl der rasche Abbau überschüssigen Thioesterpeptids für die Selektivität der Markierungsreaktion in Lebendzellstudien vorteilhaft sein kann, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Stabilität der Thioesterkonjugate zu erhöhen. In der nativen chemischen Ligation hängt die Thioesterreaktivität neben der Acylkomponente auch von der Natur der Thiolkomponente ab. So reagieren Arylthioester in der Regel schneller als Alkylthioester.<sup>[102, 116]</sup> Für die Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion wurde bislang für alle Konjugate Mercaptophenyllessigsäure (MPAA) als Thiolbaustein verwendet. Um die Hydrolysebeständigkeit zu erhöhen, wurden nun verschiedene Alkylthiolbausteine getestet (Abb. 4.26).



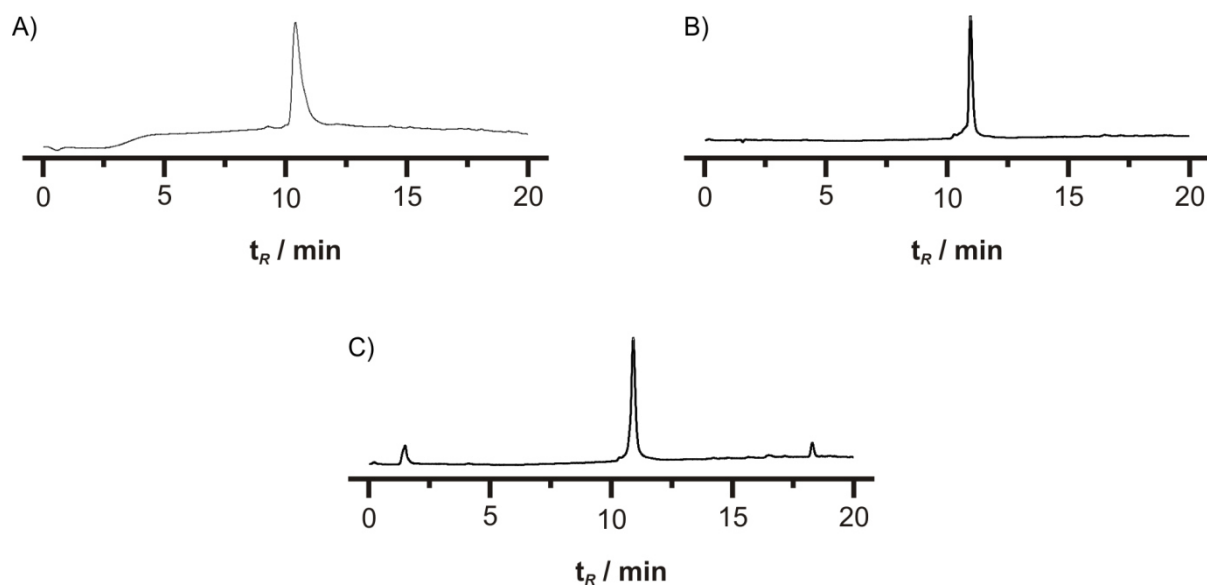
**Abbildung 4.26:** Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion mit Alkylthioester-Peptiden (R = TAMRA-G).

Für die Untersuchung wurden Mercaptopropionsäure (MPA), Mercaptoessigsäure (MAA) sowie *N*-Acetylcystein (Ac-Cys) ausgewählt. Beim *N*-Acetylcystein befinden sich zwei Acylgruppen in  $\beta$ -Stellung zum Schwefel, die einen negativen induktiven Effekt ausüben. Im Gegensatz dazu befindet sich nur eine Acylgruppe in  $\beta$ -Stellung bei der Mercaptoessigsäure und um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe weiter entfernt bei der Mercaptopropionsäure. Durch die sinkende Acidität der Thiolgruppe wird erwartet, dass ebenso die Fluchtgruppeneigenschaften abnehmen in der Reihe  $\text{Ac-Cys} > \text{MAA} > \text{MPA}$ .

Für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese wurden MPA und MAA nach einer Vorschrift von Barlos *et al.*<sup>[113]</sup> als *S*-Mmt-geschützte Bausteine **79a** und **b** dargestellt (4.27A). Für die Darstellung von *S*-Mmt-*N*-Acetyl-Cystein (**79c**) wurde diese Vorschrift adaptiert. Ausgehend von *N*-Acetylcystein (**78c**) wurde die Thiolfunktion durch Zugabe von Monomethoxytritylchlorid (Mmt-Cl) und DIPEA in DMF und Dichlormethan geschützt (Abb. 4.27A). Die Synthesen der Alkylthioesterpeptide (**82** - **84**) sind in Abbildung 4.27B gezeigt und erfolgten analog der des TAMRA-MPAA-K3-Konjugats **44** am Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker (**17**). Der Aufbau des K3-Peptidstammes wurde mittels automatisierter Festphasensynthese durchgeführt.



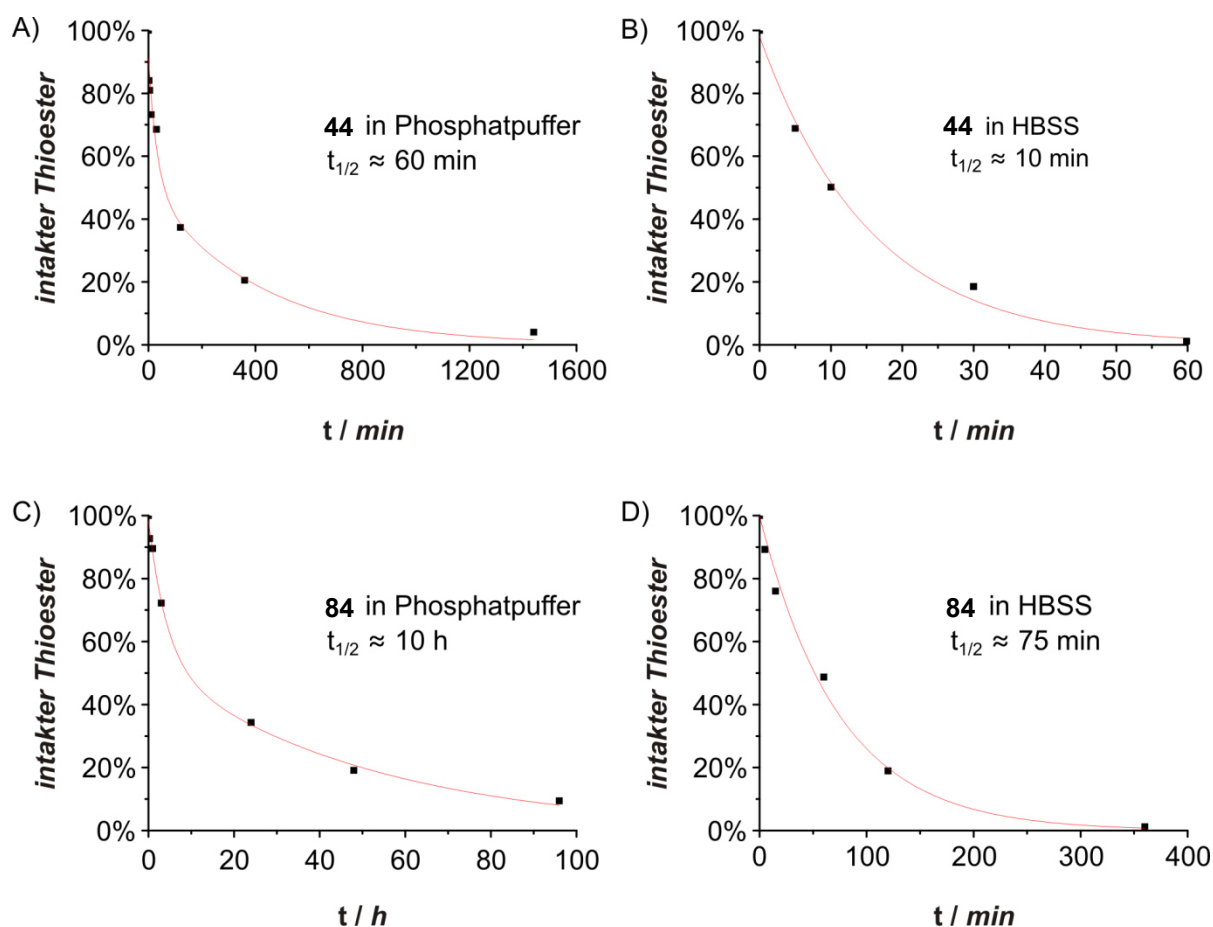
**Abbildung 4.27:** (A) Synthese der *S*-Mmt-Alkylthiole **79a-c**, a) Mmt-Cl, DIPEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DMF, 1h, RT; (B) Festphasensynthese der Alkylthioesterpeptide **82** - **84**.



**Abbildung 4.28:** Chromatogramme der Verbindungen (A) **82**, (B) **83** und (C) **84**.

Nach dem Entschützen der  $\alpha$ -Aminofunktion wurden anschließend die SMmt-geschützten Thiolbausteine- (**79a-c**) und anschließend *N*-Mmt-Glycin (**40**) gekuppelt. Danach erfolgte die Einführung der Reportergruppe durch Kupplung von (5/6)Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA). Die Alkylthioesterkonjugate- **82**, **83** und **84** wurden durch Behandlung mit TFA von den Schutzgruppen befreit und vom Harz freigesetzt.

Mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC wurde die Lebenszeit der Peptidthioester in verschiedenen Medien untersucht. Dafür wurden der Arylthioester **44** (MPAA) und der Alkylthioester **84** (Ac-Cys) in 500 nM Konzentration in Phosphatpuffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0) und in HBSS (Zusammensetzung vgl. S. 56, pH 7.4) gelöst und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 4.29 sind die Zerfallskurven und Halbwertszeiten der Thioester in den beiden Puffern dargestellt. In der Tat ist die Halbwertszeit des Ac-Cys-Thioester-Konjugats **84** in beiden Umgebungen beträchtlich höher als die des MPAA-Konjugats **44**. Außerdem ist zu beobachten, dass die Halbwertszeit der Thioester in HBSS geringer ist als in reinem Phosphatpuffer. Dies könnte auf den höheren pH-Wert von HBSS zurückzuführen sein. Jedoch ist die bestimmte Halbwertszeit des MPAA-Thioesters **44** in Phosphatpuffer mit 60 min deutlich größer als es das schnelle Erreichen des Ausbeuteplateaus bei der Acyltransferreaktion vermuten lässt (vgl. Abb. 4.21A, S. 53).

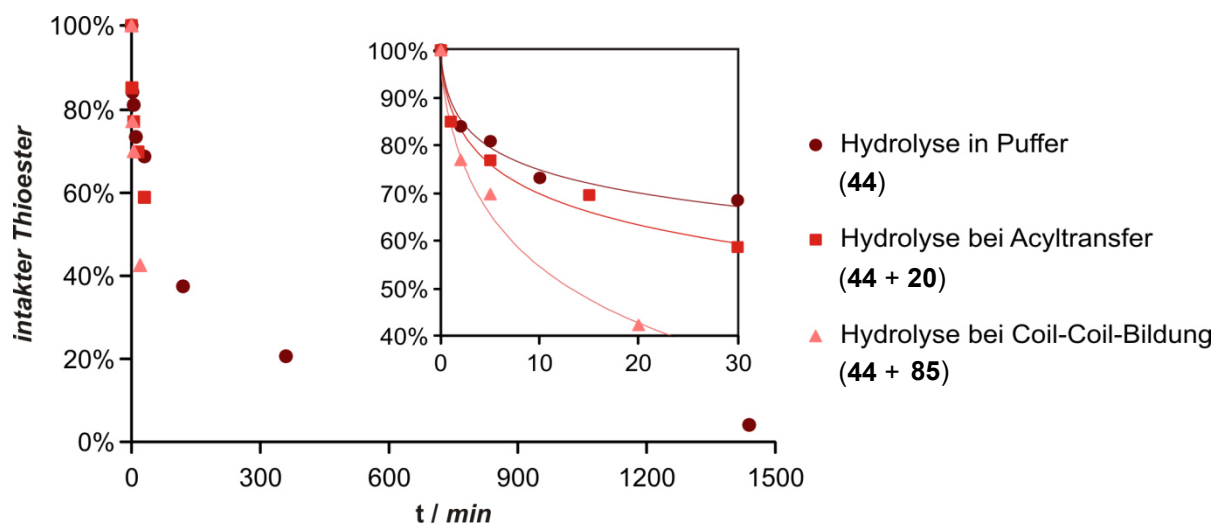


**Abbildung 4.29:** Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse und Halbwertszeiten des MPAA-Thioesterpeptids **44** in (A) Phosphatpuffer bzw. (B) HBSS und des Ac-Cys-Thioesterpeptids **84** in (C) Phosphatpuffer bzw. (D) HBSS; Bedingungen: 500 nM Peptide in 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bzw. HBSS.

Es wurde deshalb die Hydrolyse des TAMRA-MPAA-Thioesters **44** in Phosphatpuffer in drei verschiedenen Situationen verglichen: (a) MPAA-K3-Thioester allein, (B) K3-Thioester und E3-Peptid (**85**, H-(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) und (c) K3-Thioester und reaktives Cys-E3-Peptid. Die Peptide wurden dafür in 500 nM Konzentration in Phosphatpuffer gelöst und der Abbau des Thioesterpeptids **44** mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC analysiert. Der Verlauf der Hydrolyse ist in Abbildung 4.30 für alle Fälle dargestellt. Die rascheste Hydrolysereaktion wurde beobachtet, wenn **44** mit dem nicht reaktiven E3-Peptid **85** inkubiert wird (▲, Abb. 4.30). Mit einer Halbwertszeit von ca. 15 min ist das Thioesterpeptid unter diesen Bedingungen deutlich instabiler als in Phosphatpuffer allein ( $t_{1/2} = 60$  min, ●). Die Bildung des Coiled-Coil-Motivs scheint die Hydrolyse des Thioesters signifikant zu beschleunigen. Neben einer veränderten Geometrie und dadurch eventuell veränderten Reaktivität der Thioesterbindung im Coiled-Coil-Motiv können auch eine



Reihe anderer Ursachen spekuliert werden. Eine Untersuchung der Ursachen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

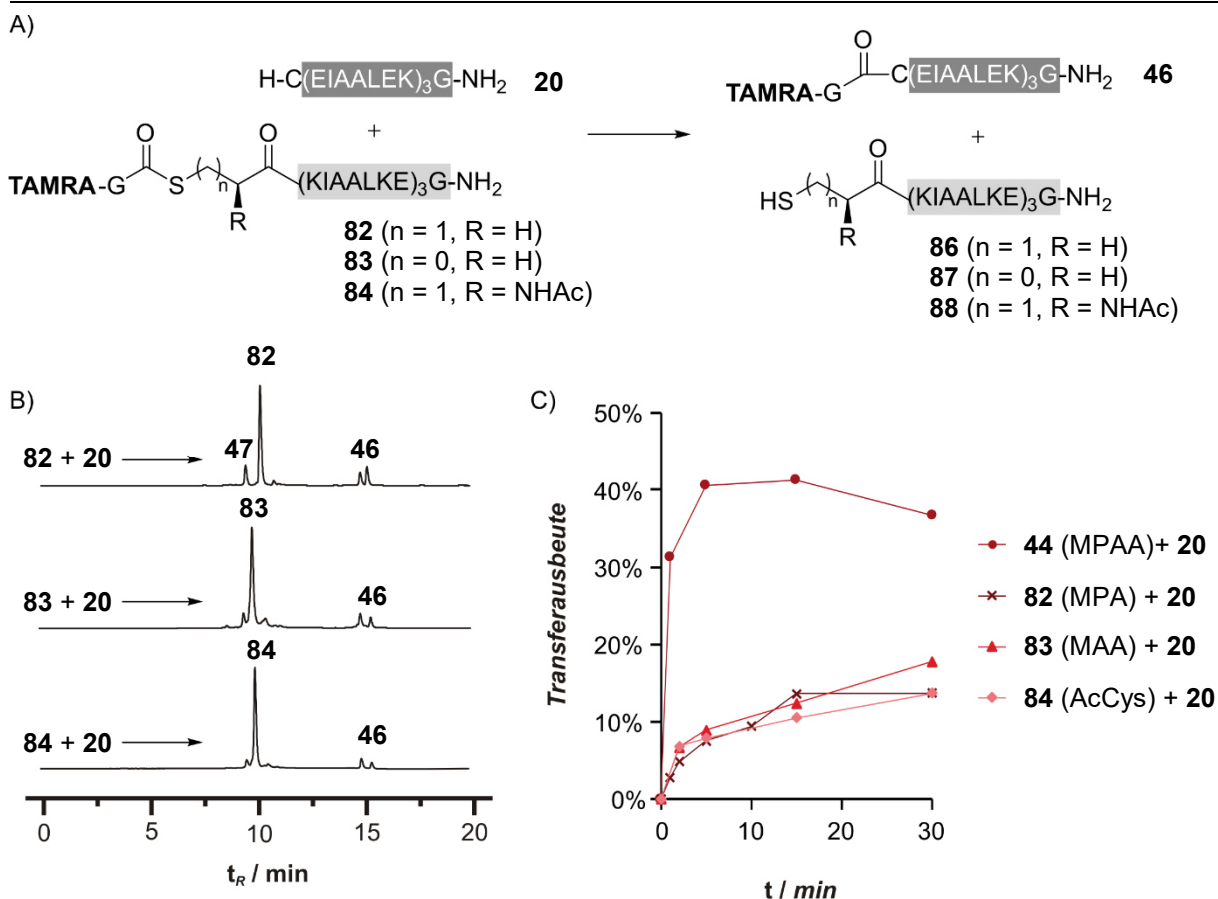


**Abbildung 4.30:** Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse des MPAA-Thioesterpeptids **44** in Phosphatpuffer allein (●), in Anwesenheit des reaktiven Cys-E3-Peptids **20** (■) und in Anwesenheit des E3-Peptids (**44** (▲)); Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (1 mM TCEP bei Reaktion mit **20**), pH 7.

Im nächsten Schritt wurden die Alkylthioesterkonjugate **82** - **84** mit dem reaktiven Cys-E3-Peptid **20** in Phosphatpuffer bei 500 nM Konzentration zur Reaktion gebracht. Da für die Markierung von Rezeptoren auf der Oberfläche lebender Zellen eine kurze Reaktionszeit von höchstem Interesse ist, wurde der Verlauf des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers nur über einen Zeitraum von 30 min mittels Fluoreszenz-detektierter HPLC untersucht. Die Transferausbeuten der Alkylthioester sind in Abbildung 4.31C zusammen mit der des Arylthioesterpeptids **44** (MPAA) dargestellt. Während einer 30-minütigen Reaktion mit dem Cysteinylopeptid erreicht der TAMRA-MAA-Thioester (**83**) eine Ausbeute von 18%, während das TAMRA-MPA- (**82**) und das TAMRA-AcCys-Konjugat (**84**) 14% Markierungsausbeute liefern (Abb. 4.31A). Bei der angestrebten Anwendung der Peptidtemplat-vermittelten Acyltransferreaktion für die Markierung von Membranproteinen auf lebenden Zellen sind kurze Markierungszeiten mit guter Markierungsausbeute von großer Bedeutung. Die erreichten Markierungsausbeuten der Alkylthioesterpeptide **82** - **84** nach 30 min Reaktionszeit sind zu gering, um für diese Anwendung nützlich zu sein.

Für den Einsatz des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers in der Markierung intrazellulärer Proteine könnte die geringere Reaktivität und damit größere Hydrolysestabilität der Alkylthioester-Konjugate jedoch vorteilhaft sein.



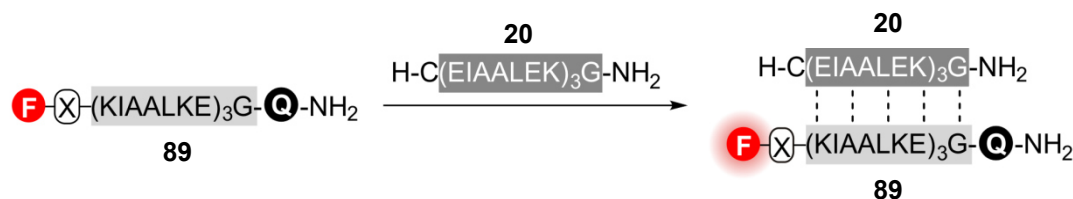


**Abbildung 4.31:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen den Alkylthioester-Konjugaten **82** - **84** und dem Cys-E3-Peptid **20**; (B) FLD-HPLC-Analyse der Reaktionen nach 30 min Reaktionszeit; (C) zeitlicher Verlauf der Ausbeute der Acyltransferreaktion der Alkylthioester (**82** - **84**) und des Arylthioesters **44**; Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm.

Um intrazelluläre Proteine mit Cys-E3-Erkennungssequenz markieren zu können, muss das Thioester-K3-Peptid z.B. mit einem zellpenetrierenden Peptid konjugiert werden, um ins Zellinnere zu gelangen. Die Inkubationszeit der Zellen mit solchen Konjugaten beträgt in der Regel 30 min bis 2 h<sup>[117]</sup> über die der Thioester hinweg stabil sein sollte.

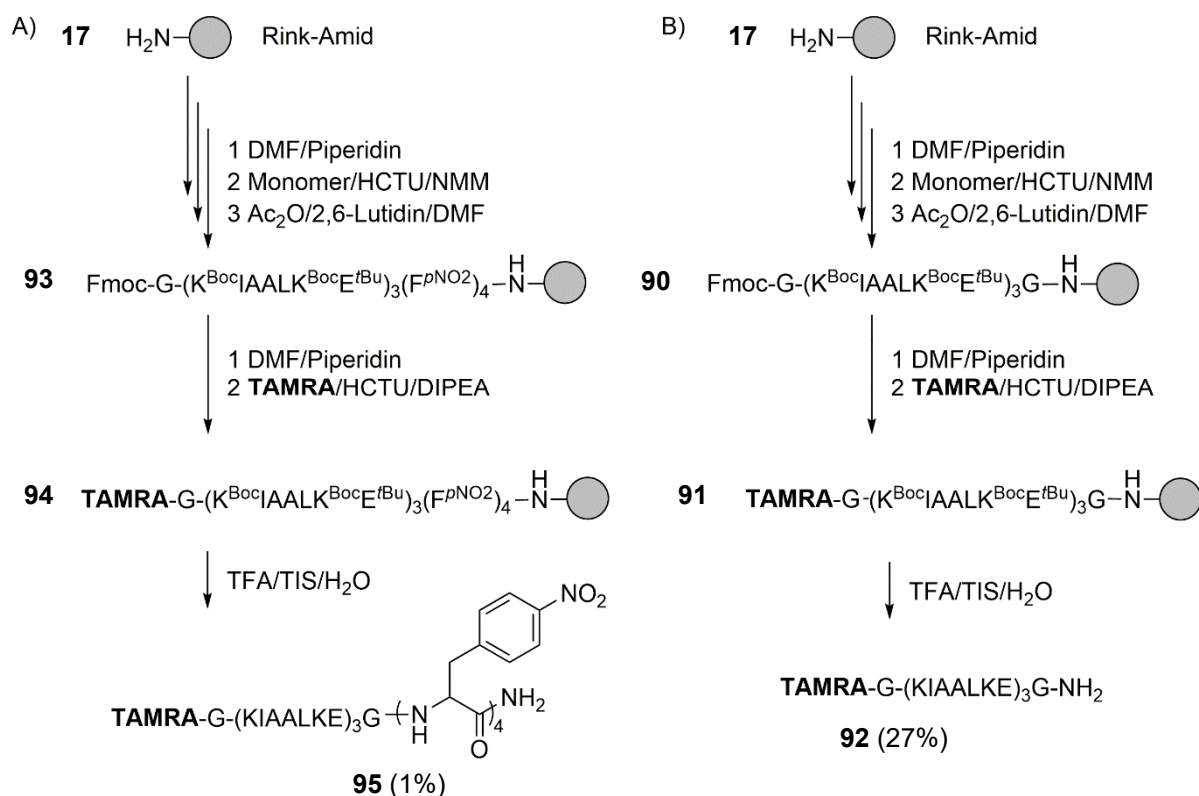
Da überschüssige Thioesterpeptide aus dem Zellinneren nicht gewaschen werden können, aber trotzdem ein Fluoreszenzsignal geben, wäre eine anschaltbare Fluoreszenz wünschenswert. Auf diese Weise würde die Hintergrundfluoreszenz geringgehalten werden und auch Proteine mit geringem Expressionsniveau könnten visualisiert werden. Um die Fluoreszenz des Reporters im freien K3-Peptid zu löschen, könnte dieses am C-Terminus mit mehreren Fluoreszenzlöschereinheiten versehen werden. Im freien Zustand liegt das Peptid als ungeordnetes *random coil* (dt. Knäuel) vor. Dabei gelangen Fluorophor und Löschermoleküle in räumliche Nähe und die Fluoreszenz wird durch den Prozess der

Stoßlöschung ausgeschaltet. Im idealen Zustand würden Reporter und Quencher durch Ausbildung des E3/K3-Coiled-Coils getrennt werden und die Fluoreszenz angeschaltet werden (Abb. 4.32).



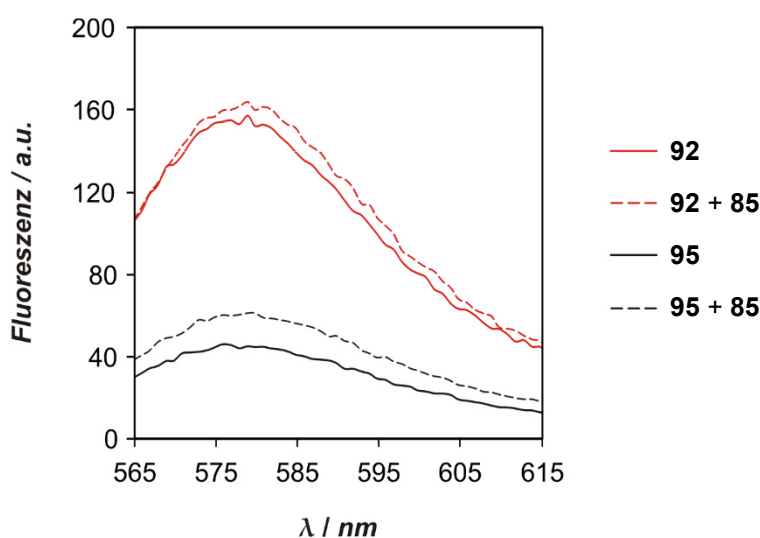
**Abbildung 4.32:** Konzept der anschaltbaren Fluoreszenz durch Stoßlöschung im ungebundenen Zustand.

Zur Überprüfung des Konzepts wurden als Fluoreszenzlöcher vier *para*-Nitrophenylalanin-Einheiten<sup>[118]</sup> an Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker (**17**, Abb. 4.33A) gekuppelt. Anschließend wurde der K3-Peptidstamm mittels automatisierter Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie aufgebaut. Um ein ungewünschtes Anschalten der Fluoreszenz durch Hydrolyse des Thioester während der Untersuchung auszuschließen, wurde die Reportergruppe TAMRA als Amid an den Peptidstamm angeknüpft. Die Behandlung mit TFA entfernte die Schutzgruppen und setzte das Produkt **95** von Harz frei.



**Abbildung 4.33:** Festphasensynthese der TAMRA-K3-Konjugate **95** und **92**.

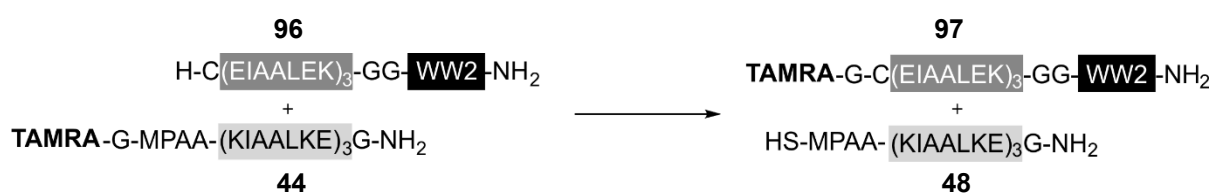
Analog zu diesem Konjugat wurde als Kontrollverbindung das TAMRA-K3-Peptid **92** ohne C-terminale Fluoreszenzlöschereinheiten ebenfalls nach Fmoc-Strategie an der festen Phase synthetisiert (Abb. 4.33B). In Abbildung 4.34 sind die durch Anregung bei  $\lambda = 555$  nm erhaltenen Fluoreszenzspektren der beiden TAMRA-K3-Konjugate **95** und **92** gezeigt. Die Messungen wurden bei 25°C und einer Peptidkonzentration von 500 nM in Phosphatpuffer durchgeführt. Bei dem Emissionsmaximum  $\lambda = 580$  nm betrug die Fluoreszenzintensität des Quencher-tragenden TAMRA-Konjugats **95** (—) nur ungefähr ein Viertel des entsprechenden TAMRA-K3-Peptids **92** (.....). Die vier *para*-Nitrophenyl-Einheiten führen also zu einer effizienten Löschung der TAMRA-Fluoreszenz. In Gegenwart von einem Äquivalent komplementärem E3-Peptids (**85**, H-(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) wurde ein Ansteigen der Fluoreszenz beobachtet (---), jedoch nur um den Faktor 1.4 und nicht auf das Niveau des ungelöschten Konjugats. Auch für **92** führte die Zugabe des E3-Peptids zu einem geringen Ansteigen der Fluoreszenzintensität um den Faktor 1.1 bei  $\lambda = 580$  nm (-.-.-). Insgesamt scheint die räumliche Entfernung zwischen Fluorophor und Löscher im Coiled-Coil-Peptid nicht auszureichen, um den Energietransfer zwischen beiden Einheiten zu unterdrücken. Für die Versuche zur Markierung von intrazellulären Proteinen (vgl. S. 76) wurden deshalb TAMRA-K3-Thioester ohne zusätzliche Fluoreszenzlöscher eingesetzt.



**Abbildung 4.34:** Fluoreszenzspektren der TAMRA-K3-Peptide **95** und **92** bei  $\lambda = 555$  nm in Abwesenheit und Anwesenheit des komplementären E3-Peptids **85**. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 25°C,  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 565 - 615$  nm.

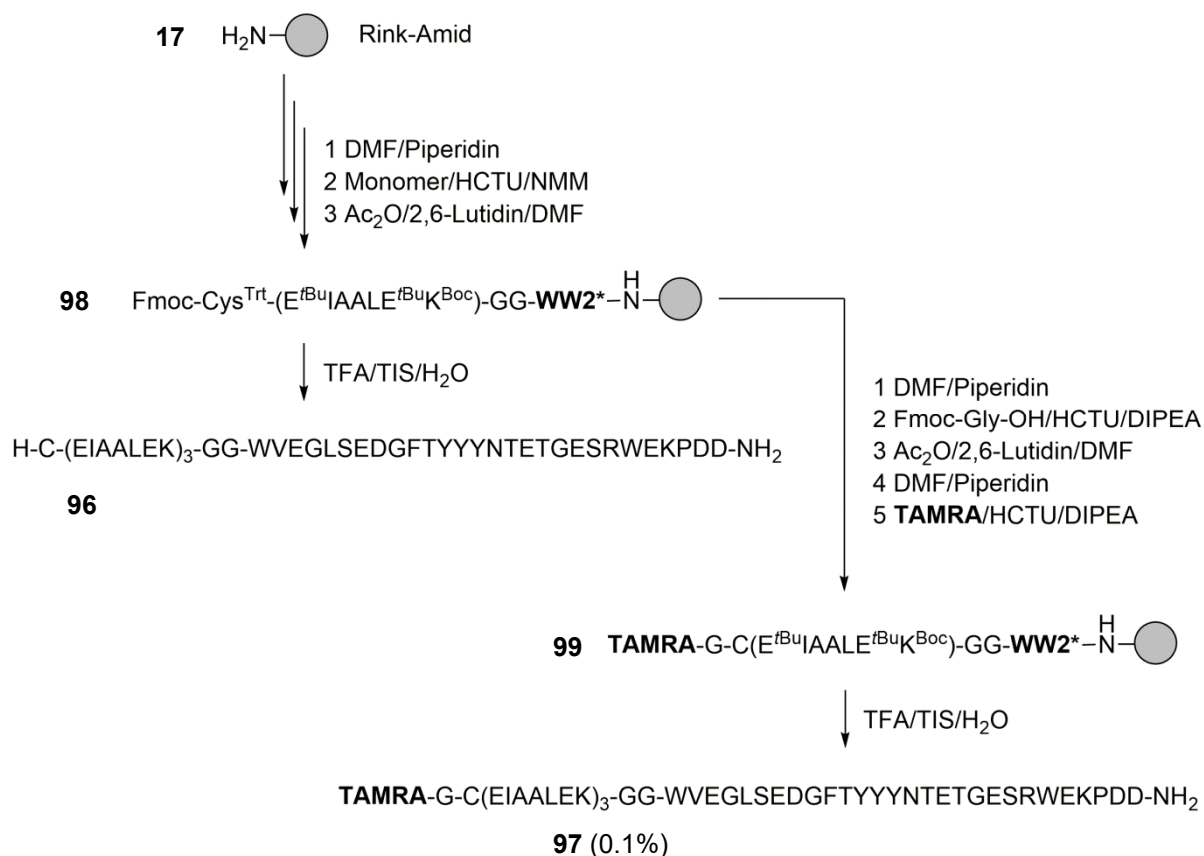
### 4.2.3 Anwendung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers auf die Proteinmarkierung

Nach den Versuchen zur Optimierung der Peptidtemplat-vermittelten Acyltransferreaktion sollte diese nun für die selektive Markierung kleiner Proteindomänen *in vitro* angewendet werden. Hierfür wurde die 5.8 kDa schwere WW2-Domäne ausgewählt, welche N-terminal mit der Cys-E3-Erkennungssequenz ausgestattet wurde (**96**, Abb. 4.35).



**Abbildung 4.35:** Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion für die Markierung der WW2-Domäne *in vitro*.

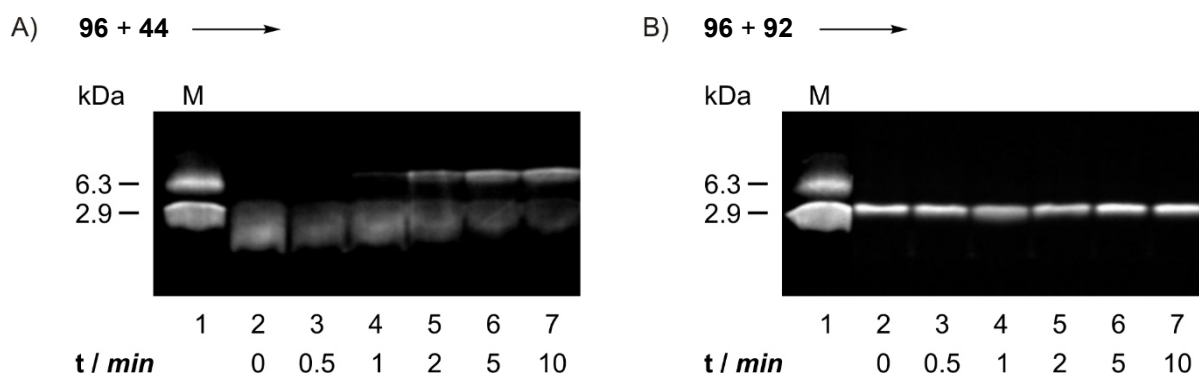
Die 28 AA lange WW2-Domäne wurde mittels automatisierter Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie am Tentagel-Harz mit Rink-Amid-Linker synthetisiert (**17**, Abb. 4.36). Nach Einführung eines Gly-Gly-Abstandshalters erfolgte die Synthese des E3-Peptidstammes und die anschließende N-terminale Funktionalisierung mit Cystein (**98**).



**Abbildung 4.36:** Festphasensynthese der Cys-E3-WW2-Domäne **96** und des Transferprodukts **97**.

Das Produkt **96** konnte abschließend durch Behandlung mit TFA von den Schutzgruppen befreit und vom Harz abgespalten werden. Die Ausbeute und Reinheit des Konjugats **96** waren niedrig. WW2-Domänen gelten aufgrund ihrer  $\beta$ -Faltblattstruktur als „schwierige“ Peptide. Schon während der Peptidsynthese in organischen Lösungsmitteln tendieren diese Peptide zur Bildung intra- und intermolekularer Aggregate, welche die Effizienz der Kupplungsreaktionen herabsetzen und zu einem hohen Anteil an Abbruchsequenzen führen.<sup>[119]</sup> Ausgehend vom Intermediat **98** wurde außerdem das Transferprodukt **97** dargestellt, welches als synthetische Referenz für die Analyse der Acyltransferreaktion durch Gelelektrophorese dienen sollte.

Für die Markierung des Proteins **96** wurde dieses in 500 nM Konzentration in PBS-Puffer mit 1 mM TCEP vorgelegt. Nach Zugabe von zwei Äquivalenten TAMRA-MPAA-K3-Konjugat **44** wurden der Reaktionsmischung nach verschiedenen Zeitpunkten Aliquote entnommen. Dabei wurde die Reaktion durch Zugabe von 2vol% TFA gestoppt. Der Verlauf der Transferreaktion wurde mittels einer Fluoreszenz-detektierten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Abb. 4.37A).



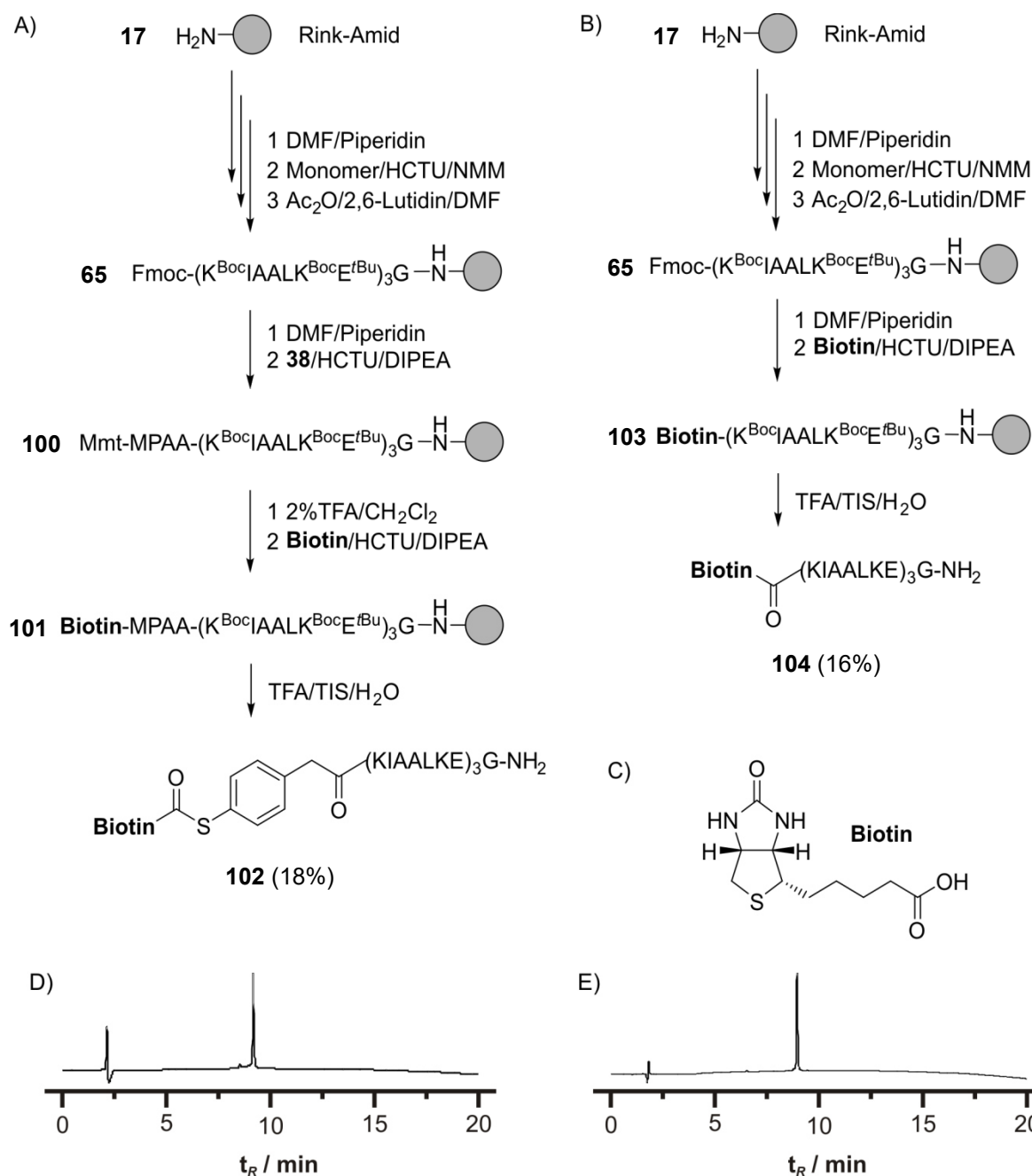
**Abbildung 4.37:** Fluoreszenz-detektierte SDS-PAGE-Analyse der Reaktion der Cys-E3-tragenden WW2-Domäne mit (A) dem TAMRA-K3-Thioester **44** oder (B) dem TAMRA-K3-Amid **92** (Kontrolle). Markierungsbedingungen: 500 nM Cys-E3-WW2, 1  $\mu$ M K3-Peptid (**44** oder **92**), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7.2.

Das Fluoreszenzimaging des Gels zeigte bei der Reaktion des TAMRA-Thioesters **44** mit dem Akzeptorkonjugat **96** nach ein bis zwei Minuten Reaktionszeit das Auftreten einer neuen fluoreszierenden Bande in der erwarteten Gewichtsregion des Transferprodukts **97** (Abb. 4.37A, Spur 4 und 5). Die Markierung der Proteindomäne erfolgt also in ähnlich hoher Geschwindigkeit, wie es für das reine Cys-E3-Peptid **20** der Fall war (vgl. Abb. 4.22A, S. 54). Die TAMRA-markierte WW2-Domäne wurde nach 10 min Reaktionszeit in 58%

Ausbeute erhalten. Um zu überprüfen, ob die Reportergruppe tatsächlich kovalent auf das Zielprotein übertragen wurde und das Reaktionsprodukt nicht nur durch die E3/K3-Wechselwirkungen als fluoreszierende Bande detektiert wird, wurde **96** zudem mit dem unreaktiven TAMRA-K3-Peptid **92** inkubiert. In diesem Peptid ist der Fluorophor als Amid an den K3-Stamm geknüpft und kann nicht übertragen werden. Das Kontrollexperiment führte zu keiner neuen fluoreszierenden Bande im Gel (Abb. 4.37B, Spur 2-7).

Der nächste Schritt beinhaltete die Markierung eines Membranproteinmodells. Für die Lebendzellexperimente stellte sich die N-terminale Markierung des humanen Neuropeptidrezeptors Y<sub>2</sub> als besonders interessant heraus. Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten 7-Transmembranproteine und spielt eine wichtige Rolle bei Epilepsie und der Regulation der Nahrungsaufnahme.<sup>[120]</sup> Sarah Zernia (AK Prof. Beck-Sickinger, Universität Leipzig) fusionierte im Rahmen ihrer Masterarbeit das extrazelluläre Segment dieses Rezeptors (1-46) an das fluoreszierende Protein eYFP und stattete es N-terminal mit der Cys-E3-Erkennungssequenz und einem Hämagglutinin-Epitop (HA) aus. Das resultierende Konstrukt Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP-His<sub>6</sub> (**105**) wurde von ihr in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend isoliert. Ebenso führte sie die Transferexperimente sowie die Analyse mittels SDS-Page/Blot durch. An diesem Modellprotein sollte der Transfer eines Biotins (Abb. 4.38C) untersucht werden, welches durch seine hochspezifischen Wechselwirkungen mit Streptavidin detektiert werden kann.

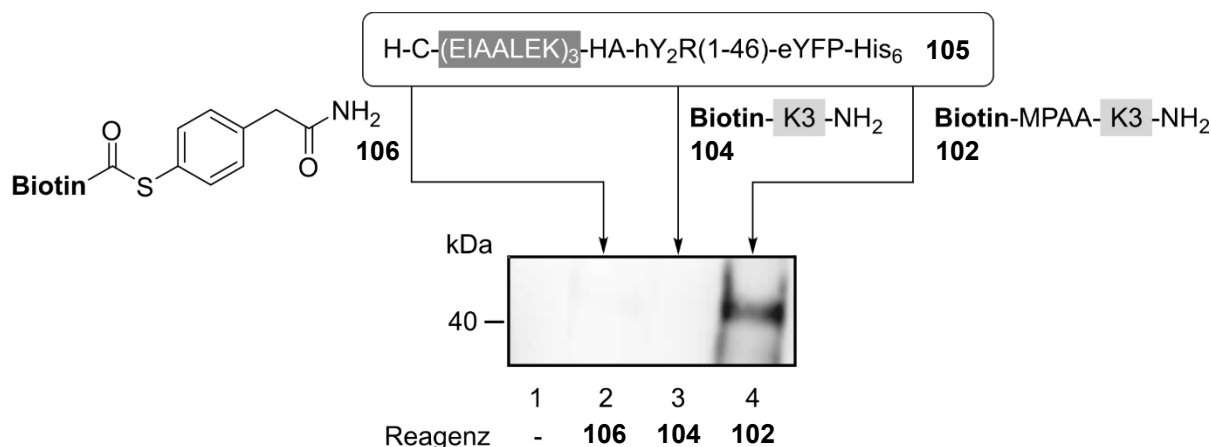
Die Synthese des Biotin-K3-Thioesters (**102**) erfolgte am Rink-Amid-Linker beladenen Tentagel-Harz (**17**, Abb. 4.38A). Der Aufbau des K3-Peptidstammes erfolgte mittels automatisierter Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie. Die anschließende Kupplung des MPAA-Bausteins (**38**) und des Biotins wurden manuell durchgeführt. Die Synthese des Amid-verknüpften Biotin-K3-Peptids (**104**) erfolgte analog (Abb. 4.38B). Die Behandlung mit TFA entfernte die Schutzgruppen und setzte die Produkte **102** und **104** vom Harz frei. Das Konstrukt Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP-His<sub>6</sub> (**105**) wurde als Donorpeptid **102** zur Reaktion gebracht. Als Negativkontrollen dienten das Amid-verknüpfte Biotin-K3-Peptid **104** sowie ein Biotin-Thioester ohne K3-Peptidstamm (**106**, Abb. 4.39).



**Abbildung 4.38:** (A)&(B) Festphasensynthesen der Biotin-K3-Peptide **102** und **104**. (C) Struktur von Biotin. Chromatogramme der Verbindungen (D) **102** und (E) **104**.

Nach einer Reaktionszeit von 2 min wurde der Biotintransfer durch SDS-PAGE und einen anschließenden Blot untersucht. Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und einer anschließenden enzymatischen Chemolumineszenz-Reaktion. Die Inkubation des E3-tragenden Proteins **105** mit dem Donorkonjugat **102** führte zu einer starken Bande im Gel in der Höhe der Molmasse, die für das Transferprodukt erwartet wird (37.5 Da, Abb. 4.39, Spur 4). Das Protein **105** wurde nicht biotinyliert durch die Kontrollverbindungen **104** und **106**, welchen entweder die

Thioesteranknüpfung oder das K3-Peptid fehlen (Abb. 4.39, Spur 2 + 3). Dies zeigt, dass die native chemische Ligation zwischen **105** und **106** alleine nicht ausreicht, um eine schnelle und effiziente Markierung zu erreichen. Vielmehr bedarf es der Erkennung des E3-Peptids durch das thioesterbeladene K3-Konjugat.



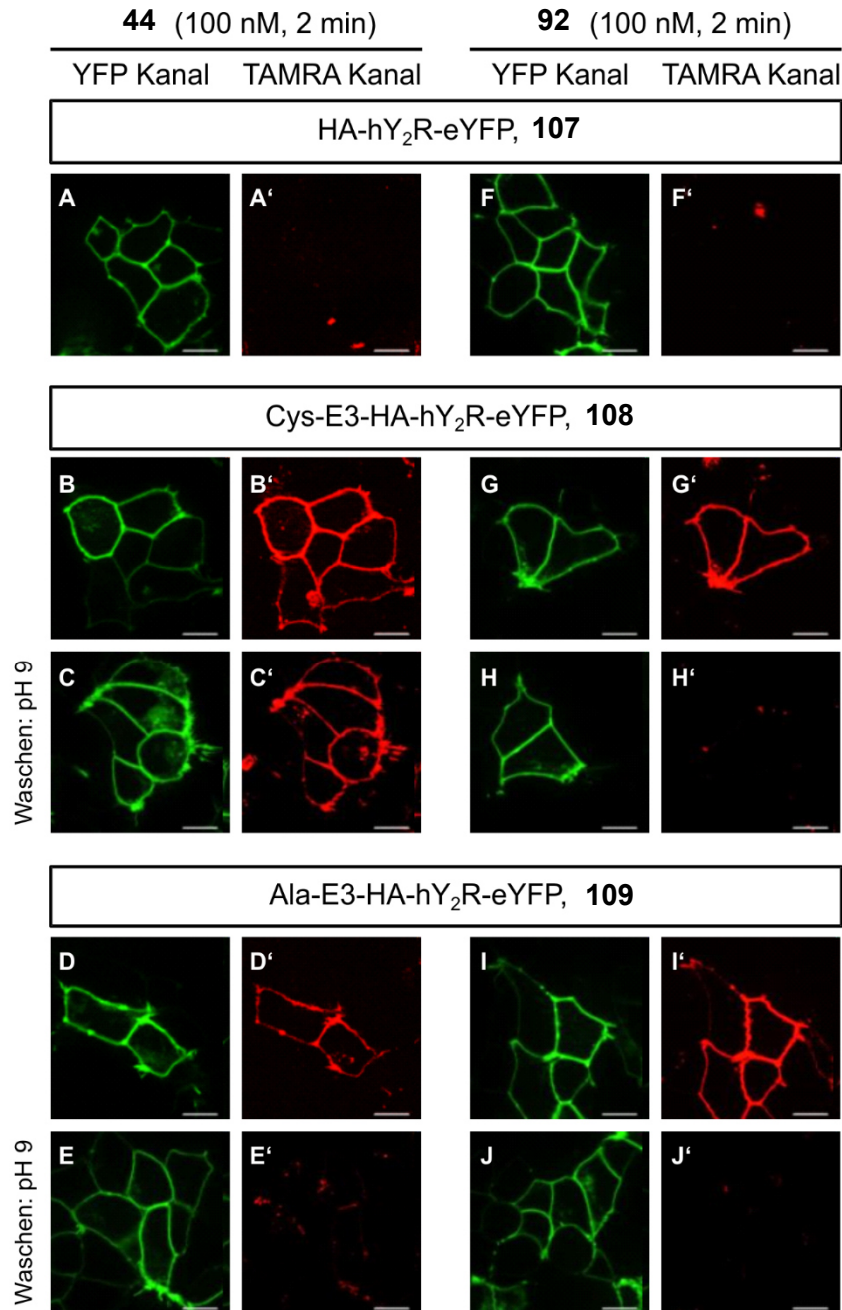
**Abbildung 4.39:** Western-Blot-Analyse der Reaktion zwischen dem Cys-E3-tragenden hY<sub>2</sub>R(1-46)-eYFP-His<sub>6</sub> **105** (37.5 kDa) und den Biotin-Verbindungen **102**, **104** und **106** nach 2 min Reaktionszeit. Markierungsbedingungen: 10 µM Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP-His<sub>6</sub> (**105**), 25 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4; Aliquote gequenchet durch Zugabe von 5 µL 1M NaOH.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Peptidtemplat-vermittelten Proteinmarkierung in Lebendzellexperimenten vorgestellt. Im Rahmen seiner Doktorarbeit konstruierte Jonathan Lotze (AK Prof. Beck-Sickinger, Universität Leipzig) die benötigten Vektoren, transfizierte Zellen, führte die Markierungsexperimente mit den in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 vorgestellten Thioesterpeptiden und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen durch. Für diese Experimente wurden die Peptid-Konjugate zur Verfügung gestellt und Vorschläge für die Optimierung des Markierungsprotokolls unterbreitet.

Für die Markierung des vollständigen humanen Y<sub>2</sub>-Rezeptors wurde dieser am N-Terminus mit der Cys-E3-Erkennungssequenz ausgestattet. Um die korrekte Lokalisation des Proteins in der Zellmembran überprüfen zu können, wurde es zusätzlich am C-Terminus genetisch mit dem fluoreszierenden Protein eYFP fusioniert (Konstrukt **108**, Abb. 4.40). Als Kontrolle diente das hY<sub>2</sub>R-eYFP-Konstrukt ohne E3-Tag (**107**). Konstrukt **109** trägt ebenfalls die E3-Sequenz, aber das Cystein wurde durch ein Alanin ersetzt. Die Konstrukte hY<sub>2</sub>R-eYFP (**107**), Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP (**108**) und Ala-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP (**109**) wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert. Fluoreszenzmikroskopie im YFP-Kanal ( $\lambda_{Em} = 488 - 512$  nm,



$\lambda_{\text{Ex}} = 520 - 550 \text{ nm}$ ) machte deutlich, dass alle Konstrukte gleichmäßig in die Membran der Zellen integriert sind (Abb. 4.40). Das E3-Tag wirkt sich also nicht störend auf die Lokalisation des Rezeptors aus.

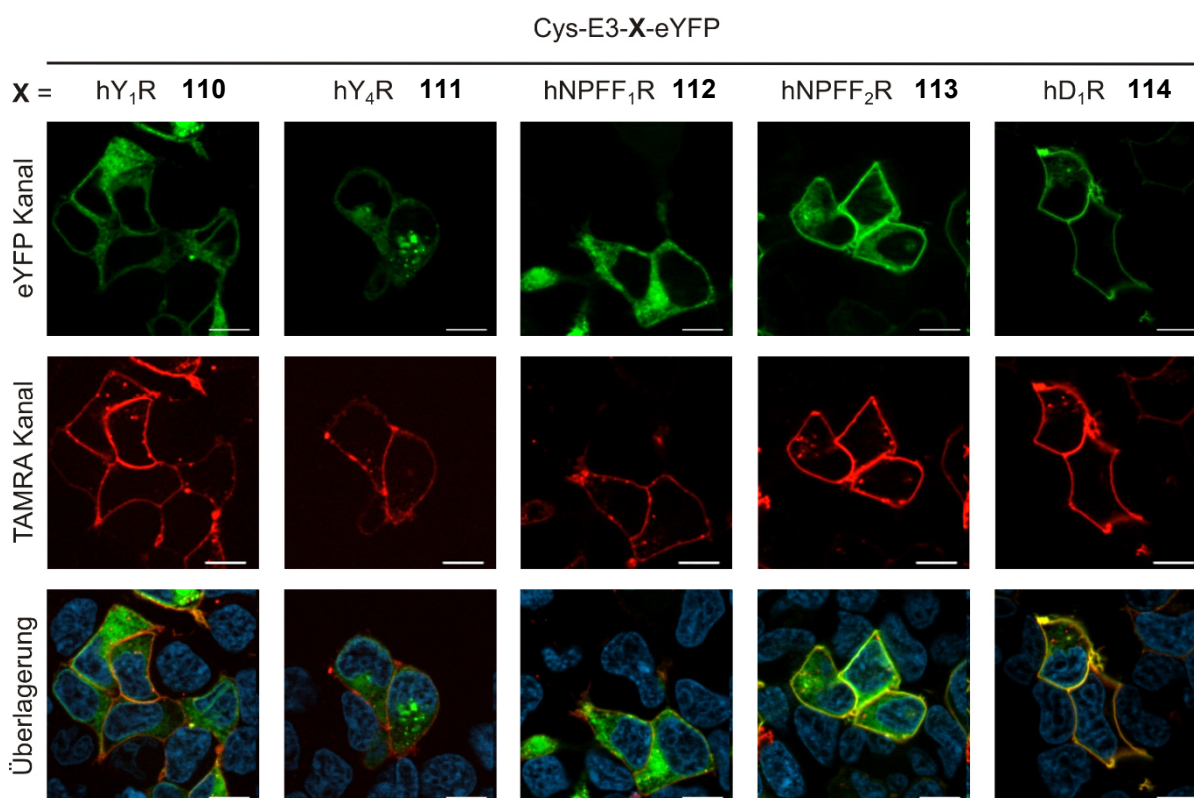


**Abbildung 4.40:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die transient mit HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP (**107**), Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP (**108**) oder Ala-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP (**109**) transfiziert sind nach der Inkubation mit dem Markierungsagens **44** (Block links) bzw. dem unreaktiven TAMRA-K3-Amid **92** (Block rechts); Markierungsbedingungen: 100 nM Peptid **44** bzw. **92** in HBSS mit 1% BSA, nach 2 min Markierungszeit Austausch der Lösung durch HBSS; basischer Waschschrift: 200 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9, 3 min; Fluoreszenzmikroskopie: 0.4–1.3 s Belichtung für eYFP-Filter, 4 s Belichtung für TAMRA-Filter, der Maßstab misst 10  $\mu\text{m}$ .

Die Zellen wurden anschließend mit einer Markierungslösung aus 100 nM TAMRA-K3-Thioester **44** in HBSS mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) behandelt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Markierungslösung durch HBSS ersetzt. Fluoreszenzmikroskopie im TAMRA-Kanal ( $\lambda_{\text{Em}} = 550 - 580 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Ex}} = 590 - 650 \text{ nm}$ ) zeigte, dass nach der Markierungsreaktion Zellen, die E3-tragende Rezeptoren exprimieren, eine membranlokalisierte TAMRA-Fluoreszenz aufweisen (Bilder B' und D', Abb. 4.40). Dahingegen konnte bei Zellen ohne E3-Erkennungssequenz keine TAMRA-Fluoreszenz beobachtet werden (Bild A'). Ebenso war eine Lösung bestehend aus 100 nM TAMRA-K3-Amid **92** in HBSS mit 1% BSA in der Lage die Zellen mit den Konstrukten **108** und **109** fluoreszent zu markieren (Bilder G' und I'). Die Markierung tritt nur an der Membran der Zellen auf und nicht im Zellinneren. Beide TAMRA-K3-Peptide **44** und **92** sind nicht zellpermeable und können deshalb nur für die selektive Markierung von Membranproteinen eingesetzt werden. In einem anschließenden kurzen Waschschrift wurden die Zellen über 3 min mit 200 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) behandelt. Dies führte zu einem Auflösen der Coiled-Coil-Wechselwirkungen und der Hydrolyse des Thioesters **44**. Tatsächlich war die TAMRA-Fluoreszenz verschwunden, wenn die Zellen zuvor mit dem unreaktiven TAMRA-K3-Amid **92** inkubiert wurden (Bilder H' und J'). Dieses ist nicht in der Lage, die Reportergruppe kovalent auf das Zielprotein zu übertragen. Nach dem basischen Waschschrift blieb die Markierung des Cys-E3-tragenden Rezeptors mit dem reaktiven TAMRA-K3-Thioester **44** erhalten (Bild C'). Die TAMRA-Fluoreszenz der Zellen mit dem Ala-E3-Konstrukt **109** war nach der basischen Behandlung verschwunden (Bild E'). Bei so geringen Konzentrationen an Thioesterpeptid **44** konnte die Reportergruppe wahrscheinlich nicht durch direkte Aminolyse übertragen werden. Um eine stabile Markierung des Zielproteins zu erreichen bedarf es neben den hochspezifischen E3/K3-Coiled-Coil-Wechselwirkungen auch der Anwesenheit einer reaktiven Thioesterverknüpfung auf Seiten des K3-Peptids und eines reaktiven Cysteins auf Seiten des E3-Erkennungspeptids.

Nachdem die Markierung des humanen  $\text{Y}_2$ -Rezeptors auf lebenden Zellen durch Anwendung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers demonstriert werden konnte, sollte nun die Übertragbarkeit des Konzepts auf weitere Rezeptoren untersucht werden. Dafür wurde die Cys-E3-Erkennungssequenz genetisch an den N-Terminus von weiteren

Rezeptoren fusioniert. Um die korrekte Lokalisation der Fusionsproteine in der Membran zu überprüfen, wurde wieder C-terminal eYFP angeknüpft. Die erhaltenen Konstrukte des humanen  $\text{Y}_1$ -Rezeptors (**110**),  $\text{Y}_4$ -Rezeptors (**111**), Neuropeptid-FF1-Rezeptors (**112**), Neuropeptid-FF2-Rezeptors (**113**) und Dopamin-1-Rezeptors (**114**) wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die YFP-Fluoreszenz zeigt, dass sich bei den Zellen mit den Konstrukten **110** - **113** die Rezeptoren nicht nur in der Membran sondern auch im Zellinneren befinden (Abb. 4.41, obere Reihe). Aufgrund des erhöhten Expressionsniveaus kann die Proteinfaltung erschwert sein, weshalb ein Teil der Proteine nicht an die Membran rekrutiert werden kann. Das Konstrukt **114** wurde korrekt in der Membran der Zellen integriert. Um die Markierungsausbeuten zu erhöhen, wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem Markierungsagenz einem Reduktionsschritt unterzogen – ähnlich wie es für die *in vitro* Experimente getan wurde.



**Abbildung 4.41:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die transient mit Cys-E3-HA-hY<sub>1</sub>R-eYFP (**110**), Cys-E3-HA-hY<sub>4</sub>R-eYFP (**111**), Cys-E3-HA-NPFF<sub>1</sub>-eYFP (**112**), Cys-E3-HA-NPFF<sub>2</sub>-eYFP (**113**) oder Cys-E3-HA-hD<sub>1</sub>-eYFP (**114**) transfiziert sind, nach der Inkubation mit dem Markierungsagenz **44**; Markierungsprotokoll: 0.5 mM TCEP, 20 mM HEPES/HBSS, 10 min; 100 nM Peptid **44**, 1% BSA/HBSS, 2 min; dann Austausch der Lösung durch HBSS; Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Dafür wurden die Zellen 10 min mit einer 0.5 mM TCEP Lösung in 20 mM HEPES/HBSS behandelt. Anschließend folgte die Inkubation mit 100 nM TAMRA-K3-Thioester **44** in HBSS mit 1% BSA über 2 min bei Raumtemperatur. Nach dem Austausch der Markierungslösung gegen HBSS wurden die Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei dem Rezeptor **114** deckt sich die beobachtete TAMRA-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz des YFP (Abb. 4.41, mittlere und untere Reihe). Bei den Konstrukten **110** - **113** ist die TAMRA-Fluoreszenz nur an den Membranen lokalisiert, wo sich auch die funktionalen Rezeptoren befinden. Die im Zellinneren zurückgehaltenen Rezeptoren wurden hingegen nicht markiert.

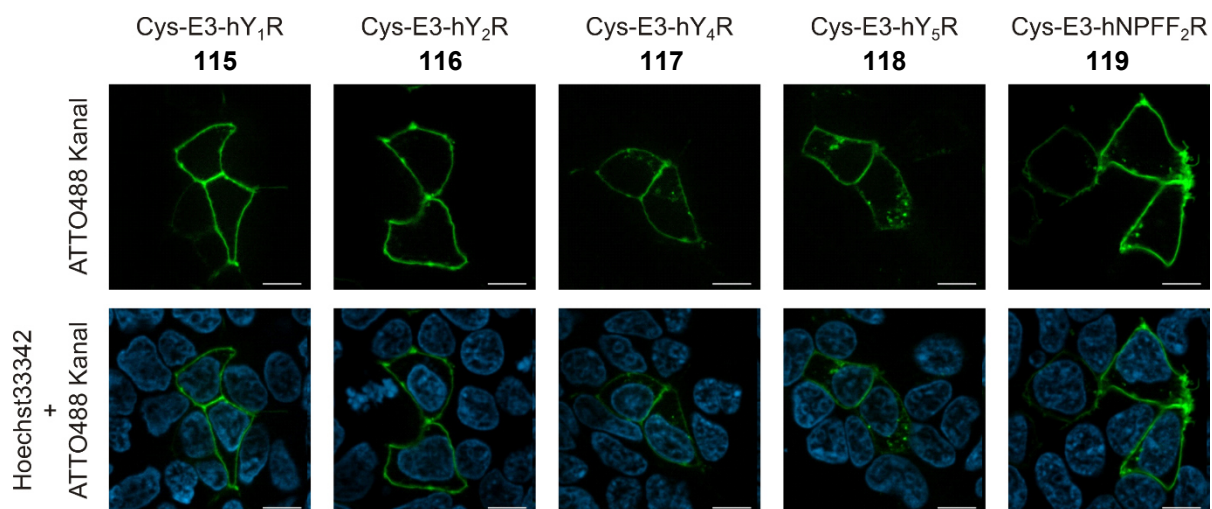
Neben der Lokalisierung musste auch untersucht werden, ob die Modifizierung des Rezeptors mit dem Cys-E3-Tag und die anschließende Markierung mittels Acyltransfer einen Einfluss auf die Aktivität des Zielproteins hat. In einem Inositolphosphat-Akkumulations-Assay wurde die Funktion der eYFP-tragenden  $Y_1$  und  $Y_2$  Rezeptoren über die  $EC_{50}$ -Werte des nativen Liganden pNPY bestimmt. Diese wurden mit den  $EC_{50}$ -Werten der entsprechenden Cys-E3-getaggten Konstrukten **110** bzw. **108** verglichen. Dafür wird das chimäre  $G\alpha_{qi}$ -Protein koexprimiert.  $Y_1$  und  $Y_2$  binden nach ihrer Aktivierung durch den Peptidliganden pNPY an das  $G\alpha_{qi}$ -Protein. Dadurch wird anschließend Phospholipase C aktiviert, was in die Akkumulation von D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) mündet. Über die Messung von IP3 lassen sich so Rückschlüsse auf die Aktivität vom  $Y_1$  bzw.  $Y_2$ -Rezeptor machen. Die bestimmten  $EC_{50}$ -Werte für den  $Y_1$ -Rezeptor mit und ohne Cys-E3-Tag befinden sich in der gleichen Größenordnung, sodass aus dem Assay geschlossen werden kann, dass die E3-Erkennungssequenz nicht die Aktivität des Proteins beeinträchtigt (Tabelle 1). Darüber hinaus wurde auch die Aktivität der Rezeptoren untersucht, die dem vollständigen Markierungsprotokoll unterzogen wurden. Die Ergebnisse des IP-Akkumulationsassays zeigen, dass die Markierung des  $Y_1$ -Rezeptors keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Im Vergleich zum Rezeptorkonstrukt ohne E3-Sequenz haben sich die  $EC_{50}$ -Werte des Cys-E3-tragenden  $Y_2$ -Rezeptors ungefähr verdoppelt. Für diesen Rezeptor scheint die Fusion mit dem Erkennungspeptid einen leichten, negativen Einfluss auszuüben.

**Tabelle 1:** Aktivitätscharakterisierung des Y<sub>1</sub> und Y<sub>2</sub> Rezeptors mit und ohne Cys-E3-Erkennungssequenz.

Rezeptor	EC <sub>50</sub> [nM]	pEC <sub>50</sub> ± SEM	<i>n</i>
hY <sub>1</sub> R-eYFP	1.2	-8.9 ± 0.08	2
Cys-E3- hY <sub>1</sub> R-eYFP	1.0	-9.0 ± 0.08	2
TAMRA-Gly-Cys-E3- hY <sub>1</sub> R-eYFP	1.2	-8.9 ± 0.09	2
hY <sub>2</sub> R-eYFP	0.3	-9.4 ± 0.06	2
Cys-E3- hY <sub>2</sub> R-eYFP	0.5	-9.2 ± 0.07	2
TAMRA-Gly-Cys-E3- hY <sub>2</sub> R-eYFP	0.6	-9.2 ± 0.05	2

EC<sub>50</sub>- und pEC<sub>50</sub>-Werte (neg. dekadischer Logarithmus vom EC<sub>50</sub>) wurden mit einem IP-Akkumulationsassay bestimmt. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten, die als Duplikat ausgeführt wurden.

Für die Verfolgung schneller biologischer Prozesse ist es vorteilhaft, wenn nicht nur die Markierungszeit, sondern das gesamte Markierungsprotokoll kurz ist. Mehrstufige Protokolle mit mehreren Waschschritten sollten deshalb vermieden werden. Es wurde nun versucht, das Protokoll der Peptidtemplat-vermittelten Proteinmarkierung zu vereinfachen. Für die nächsten Experimente wurden die humanen Neuropeptidrezeptoren Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> und Y<sub>5</sub> (115 – 118), sowie der Neuropeptidrezeptor FF2 (119) genetisch mit dem Cys-E3-Peptid fusioniert. Eine Fusionierung mit eYFP unterblieb. Nach der transienten Transfektion von HEK293-Zellen wurden diese mit einer Markierungslösung aus 100 nM ATTO488-K3-Thioester (70) und 0.1 mM TCEP in 20 mM HEPES/HBSS über 5 min inkubiert. Nach einem 1.5-minütigem basischen Waschschriff mit 150 mM NaHCO<sub>3</sub> in HBSS wurde die Lösung mit 20 mM HEPES in HBSS ausgetauscht und die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 4.42). Die ATTO488-Fluoreszenz bestätigt die erfolgreiche Markierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die für den Y<sub>5</sub>- und FF2-Rezeptor beobachtete intrazelluläre Fluoreszenz rührt wahrscheinlich von natürlich internalisierten Rezeptoren.



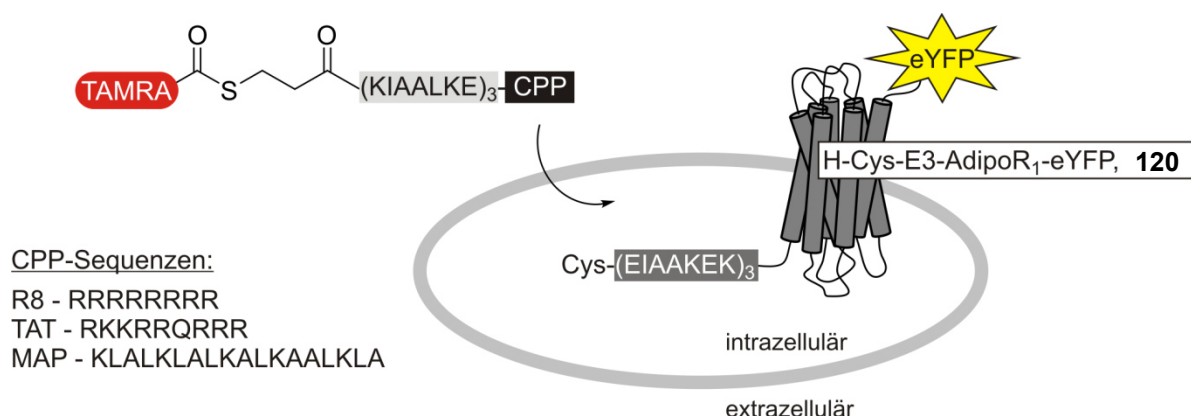
**Abbildung 4.42:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die transient mit Cys-E3-HA-hY<sub>1</sub>R-eYFP (**110**), Cys-E3-HA-hY<sub>4</sub>R-eYFP (**111**) Cys-E3-HA-NPFF<sub>1</sub>-eYFP (**112**), Cys-E3-HA-NPFF<sub>2</sub>-eYFP (**113**) oder Cys-E3-HA-hD<sub>1</sub>-eYFP (**114**) transfiziert sind nach der Inkubation mit dem Markierungsagens **70**; Markierungsprotokoll: 100 nM Peptid **70**, 0.1 mM TCEP, 20 mM HEPES/HBSS, 5 min; 150 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, HBSS; dann Austausch der Lösung durch HBSS; Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Für die Markierung von Proteinen im Inneren der Zelle, müssen die Thioesterpeptide die Zellmembran passieren. Hierfür ist einerseits der Einsatz von kommerziell erhältlichen Peptid-/Proteintransfektions-Kits denkbar, z.B. *Pierce Protein Transfection Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, USA) oder *PulsIn* (Polyplus-Transfection, Illkirch, Frankreich). Diese enthalten kationische Lipide, welche mit den Peptiden nicht-kovalente Komplexe bilden. Ebenso könnte die am MIT entwickelte Technik des *cell squeezing* (dt. Zellquetschen) angewendet werden, bei der Zellen durch eine winzige Öffnung geschickt werden und ihre Membran dadurch permeabilisiert wird.<sup>[121]</sup> Alternativ können die Thioesterpeptide auch mit sogenannten zellpenetrierenden Peptiden (CPP) konjugiert werden. Dabei handelt es sich um kurze Peptide, die die zelluläre Aufnahme eines Cargos erleichtern. Es wurde der erfolgreiche Transport von Oligonukleotiden, Antikörpern, QuantumDots und Peptiden in Zellen hinein berichtet.<sup>[122]</sup> Der genaue Mechanismus des Transports hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab und ist weitestgehend ungeklärt.<sup>[117c]</sup>

Um die Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion für die intrazelluläre Proteinmarkierung anwenden zu können, wurde das K3-Peptid mit verschiedenen zellpenetrierenden Peptiden versehen. Es wurden Oktaarginin, TAT und MAP (*model amphiphilic peptide*) ausgewählt. Als Thiolbaustein diente Mercaptopropionsäure, da die resultierenden Thioester weniger reaktiv sind als die Mercaptophenylelessigsäure-basierten



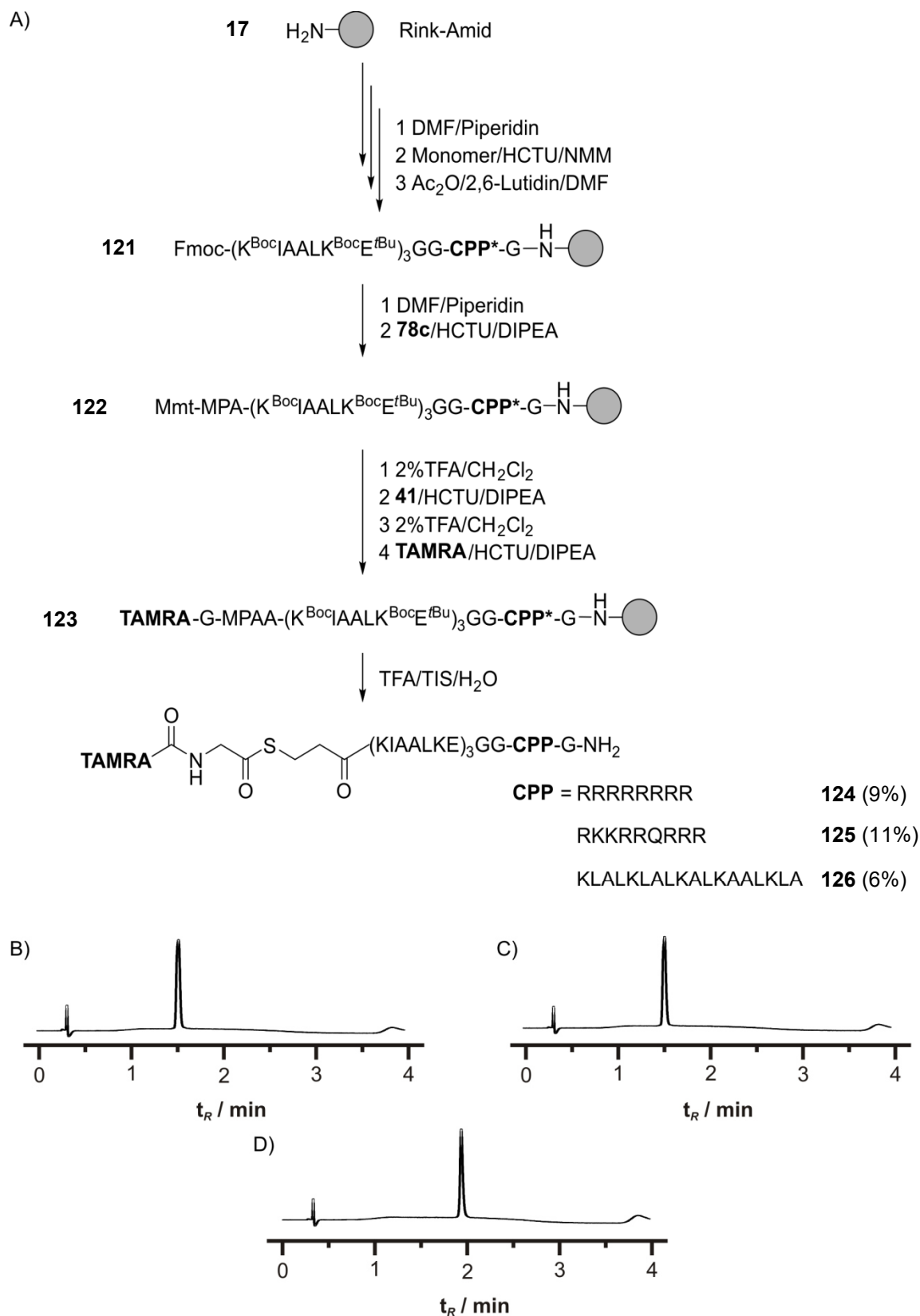
(vgl. „Einstellung der Reaktivität“, S. 58). Der Adiponektinrezeptor 1 (AdipoR<sub>1</sub>) diene als Modellprotein. Bei diesem Siebentransmembranrezeptor befindet sich der C-Terminus auf der extrazellulären Seite, während der N-Terminus ins Cytosol gerichtet ist. Der Rezeptor wurde von M. sc. Jonathan Lotze (Universität Leipzig) N-terminal mit der Cys-E3-Erkennungssequenz und C-terminal mit einem fluoreszierenden Protein ausgestattet (**120**, Abb. 4.44). Ebenso wurden die Lebendzellexperimente von Jonathan Lotze (Universität Leipzig) durchgeführt.



**Abbildung 4.43:** Schematische Darstellung der intrazellulären Markierung des Cys-E3-tragenden Adiponektinrezeptors 1 mithilfe von CPP-konjugierten K3-Thioestern.

Die Synthese der K3-CPP-Konjugate erfolgte am Rinkamid-Linker beladenen Tentagelharz (**17**, Abb. 4.44) mittels der Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie. Nach der automatisierten Synthese der drei verschiedenen CPP-Sequenzen wurde eine Glycin-Glycin-Einheit als Abstandhalter eingefügt und anschließend erfolgte die Synthese des K3-Stammes. In einem manuellen Kupplungsschritt wurden die Peptide mit *S*-Mmt-Mercaptopropionsäure (**79a**) verknüpft. Nach der Entschützung der Thiolgruppe durch Behandlung mit 2 vol% TFA in Dichlormethan wurde die Thioesterbindung durch Kupplung von *N*-Mmt-Glycin (**40**) geknüpft und die Peptide anschließend mit TAMRA als Reportermolekül beladen. Die abschließende Behandlung mit TFA führte zur Entfernung der Schutzgruppen und setzte die Produkte **124** – **126** vom Harz frei.

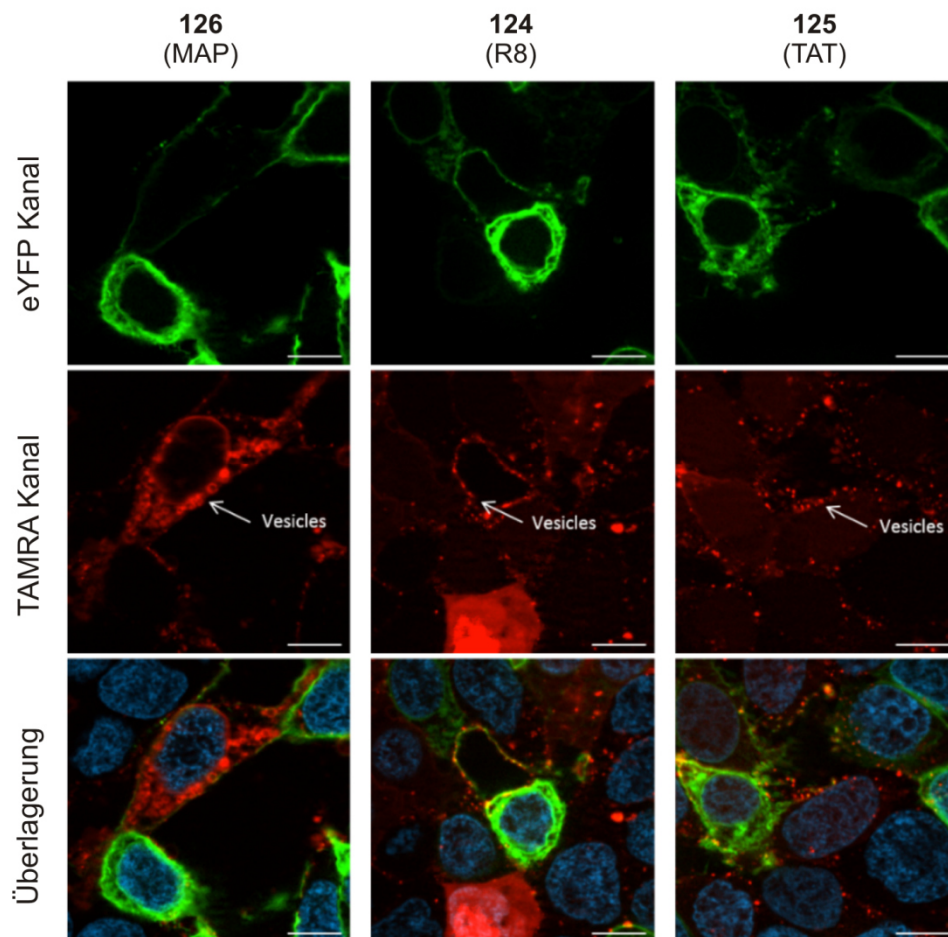
Das Konstrukt **120** wurde in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der eYFP-Fluoreszenz zeigen, dass der Rezeptor korrekt in der Membran lokalisiert ist (Abb. 4.45, obere Reihe). Die 15-minütige Inkubation der Zellen mit den Konjugaten **124** – **126** in 5  $\mu$ M Konzentration führte zu einer Internalisierung der Sonden (Abb. 4.45, mittlere Reihe).



**Abbildung 4.44:** (A) Festphasensynthese der K3-CPP-Konjugate **124** – **126**. Chromatogramme der Verbindungen (B) **124**, (C) **125** und (D) **126**.



Die TAMRA-Fluoreszenz ist jedoch nicht gleichmäßig entlang der Membran verteilt, wie es für eYFP der Fall ist. Stattdessen ist unter allen untersuchten Inkubationsbedingungen das Auftreten fluoreszierender Vesikel zu beobachten, in denen die Thioesterpeptid-Konjugate für die Markierungsreaktion nicht zur Verfügung stehen. Dies ist in Übereinstimmung mit Chernomodik *et al.*, die berichteten, dass Nonaarginin-TAMRA bei Konzentrationen höher als 10  $\mu\text{M}$  die Zellmembran direkt penetrieren kann, bei einer extrazellulären Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  oder geringer jedoch über Endozytose aufgenommen wird.<sup>[123]</sup> Die Inkubationszeit bei diesen Experimenten betrug eine Stunde. Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  an R<sub>s</sub>-Peptid konnten von Cardoso *et al.* jedoch toxische Effekte auf die inkubierten Zellen beobachtet werden.<sup>[123b]</sup>



**Abbildung 4.45:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die transient mit Cys-E3-AdipoR1-eYFP (**120**) transfiziert sind nach der Inkubation mit den K3-CPP-Konjugaten **124 – 126**; Markierungsprotokoll: 5  $\mu\text{M}$  K3-CPP-Peptide (**124**, **125** oder **126**), 20 mM HEPES, 0.5% DMSO in HBSS, 15 min bei 37°C, dann Austausch der Lösung durch HBSS; Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Sowohl die Aufnahme von CPP-Konjugaten in die Zellen, als auch die Freisetzung dieser Konjugate aus den Endosomen sind konzentrations- und zeitabhängige Prozesse. Zudem benötigt die Acyltransferreaktion mit Mercaptopropionyl-Thioestern mehrere Stunden für gute Markierungsausbeuten. Für zukünftige Experimente zum intrazellulären Acyltransfer sind deshalb bedeutend längere Inkubationszeiten von über einer Stunde und höhere Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$  von großer Bedeutung. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen erste sondierende Experimente dar, auf denen zukünftig aufgebaut werden kann.

#### 4.2.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der von Seitz *et al.* entwickelte Nukleinsäure-vermittelte Acyltransfer<sup>[98]</sup> für die Proteinmarkierung auf ein Peptidtemplat übertragen. Als Peptidtemplat wurde das *de novo* designte E3/K3-Coiled-Coil-Motiv ausgewählt.<sup>[71]</sup> Anders als bei den 2008 veröffentlichten Studien von Matsuzaki *et al.* wird hierbei eine kovalente Bindung zwischen dem Zielprotein und der Reportergruppe geknüpft. Diese bleibt auch bei der Internalisierung und dem Recycling des markierten Membranrezeptors bestehen und ermöglicht so die Visualisierung des Zielproteins über lange Zeiträume.<sup>[124]</sup> Die Markierungsreaktion verläuft nach einem Mechanismus ähnlich dem der nativen chemischen Ligation,<sup>[93]</sup> ohne die Peptide zu verknüpfen. Zusammen mit der 22 AS langen Cys-E3-Erkennungssequenz resultiert dies in einem sehr geringen Massenzuwachs am Zielprotein. Auch Ball *et al.* verwendeten eine Coiled-Coil-vermittelte Transferreaktion für die Proteinmarkierung.<sup>[74-75]</sup> Die Dirhodiummetallopeptid-katalysierte Proteinfunktionalisierung konnte bislang jedoch nur für elektronenarme Gruppen wie Biotin oder Tetraethylenglycol demonstriert werden. Die Coiled-Coil-basierten Markierungsstrategien von Xia *et al.*<sup>[76]</sup> und Matsuzaki *et al.*<sup>[77]</sup> beruhen auf einer Verknüpfung der Peptide und zeichnen sich durch einen signifikant höheren Massenzuwachs des POIs aus. Dennoch ist die Cys-E3-Erkennungssequenz mit 22 AS deutlich länger als es für die in Kapitel 2.1 vorgestellten Enzym-vermittelten Methoden der Fall ist.

Die sehr spezifischen Wechselwirkungen zwischen E3- und K3-Peptid sorgen für eine hohe Spezifität der Markierungsreaktion. Die Bildung des Coiled-Coil-Motivs erhöht die lokale Konzentration der funktionellen Gruppen an den N-Termini der Peptide und erlaubt den effizienten Transfer einer Reportergruppe auch unter Bedingungen hoher Verdünnung (100 – 500 nM). Niedrigere oder ähnliche Reagenzkonzentrationen wurden bislang nur für die Markierung von Tetraserinmotiven mit Organobisboronverbindungen<sup>[47]</sup> und die Markierung von Oligohistidinsequenzen<sup>[50, 54-55]</sup> berichtet. Gleichzeitig ist der kovalente Transfer der Reportergruppe auf ein N-terminales Cystein am POI angewiesen. Eine Markierung von intramolekularen Regionen des Zielproteins, wie sie z.B. für viele Enzym-vermittelte Markierungsstrategien berichtet wurde, ist derzeit noch nicht möglich. Auch eine N-terminale Markierung bakterieller Proteine könnte problematisch sein, wenn deren

N-terminales Methionin nicht posttranslational entfernt wird. Die Anwendung von Enzymen wie der Methionin-Aminopeptidase (MetAP) könnte dieses Problem umgehen.<sup>[125]</sup>

Es wurde eine modulare, festphasenbasierte Synthese der Überträgerpeptide nach Fmoc-Strategie entwickelt, die den Einsatz von Peptidsyntheseautomaten für die Mehrzahl der Reaktionsschritte und eine einfache Variation der Reportergruppe zulässt. Die Übertragung von drei verschiedenen Fluorophoren (TAMRA, AlexaFluor 350 und ATTO488) wurde ebenso demonstriert wie der Transfer eines Biotin-Reporters. Die Reportervielfalt erweist sich besonders nützlich für Anwendungen, bei denen maßgeschneiderte optische Eigenschaften der Reportergruppe von Nöten sind.

Die Acyltransferreaktion mit Mercaptophenyllessigsäure (MPAA)-basierten Thioestern verläuft mit hoher Geschwindigkeit. Nach zwei bis fünf Minuten wird die maximale Transferausbeute erreicht. Damit handelt es sich um eine der schnellsten bisher berichteten Strategien für die Proteinmarkierung. Kürzere Inkubationszeiten sind nur für die reversible, nicht-kovalente Markierung durch die Wechselwirkungen zwischen Ni(II)-Komplexen und Oligohistidinsequenzen<sup>[50]</sup> bzw. zwischen Coiled-Coil-Peptiden<sup>[72]</sup> erreicht worden. Die bei der Acyltransferreaktion erreichten Markierungsausbeuten werden durch die konkurrierende Hydrolysereaktion limitiert. Durch den Einsatz eines Überschusses an Thioester-K3-Peptid konnte die Ausbeute signifikant gesteigert werden. Ebenso führt der Einsatz von Alkylthiolbausteinen zu einer erhöhten Stabilität und Hydrolysebeständigkeit der Thioester. Auch in komplexen Umgebungen wie den Zellkulturmedien HBSS und DMEM\* verlief die Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion mit hoher Selektivität und Geschwindigkeit. Es wurden erfolgreich die WW2-Proteindomäne und der Extrazellulärteil des humanen  $\gamma_2$ -Rezeptors *in vitro* markiert werden.

In Kooperation mit M. Sc. Jonathan Lotze (Universität Leipzig) konnte gezeigt werden, dass sich die entwickelte Markierungsstrategie in Lebendzellexperimenten anwenden lässt. So wurden erfolgreich sieben verschiedene Rezeptoren in HEK293-Zellen exprimiert und fluoreszierend markiert. Die genetische Fusion mit der Erkennungssequenz und die Fluoreszenzmarkierung führten zu keiner großen Beeinträchtigung der Lokalisation oder Funktion der Proteine. Die K3-Thioesterpeptide sind nicht zellpermeabel, sodass selektiv die Rezeptoren an der Zelloberfläche markiert wurden. Anders als bei der Fusion mit

autofluoreszierenden Proteinen werden dabei nur die korrekt lokalisierten und funktionellen Zielpoteine markiert. Ein weiterer Vorteil gegenüber den fluoreszierenden Proteinen besteht darin, dass verschiedene Generationen von Membranrezeptoren mit unterschiedlichen Reportern ausgestattet werden können. In Kombination mit den sehr kurzen Markierungszeiten führt dies zu einer besonders hohen zeitlichen Auflösung in *pulse-chase*-Experimenten.<sup>[124]</sup>

Wegen ihrer fehlenden Zellpermeabilität wurden die Markierungssonden mit zellpenetrierenden Peptiden (Oktaarginin, TAT und KLAL) modifiziert, um für die intrazelluläre Markierung des Adiponectinrezeptors 1 eingesetzt werden zu können. Dabei handelt es sich um einen Membranrezeptor mit intrazellulärem N-Terminus. Die untersuchten Reaktionsbedingungen (5  $\mu$ M K3-CPP-Peptid, 37°C, 15 min) der ersten sondierenden Experimente führten zwar zu einer Internalisierung der Markierungssonden, jedoch waren diese in Endosomen gefangen und eine Markierung des Zielproteins gelang nicht. Für eine verbesserte Verfügbarkeit der Konjugate im Cytosol sollten in Anlehnung an berichtete Reaktionsbedingungen<sup>[123]</sup> höhere Konzentrationen und längere Inkubationszeiten gewählt werden.

# 5 Zusammenfassung und Ausblick

## 5.1 Zusammenfassung

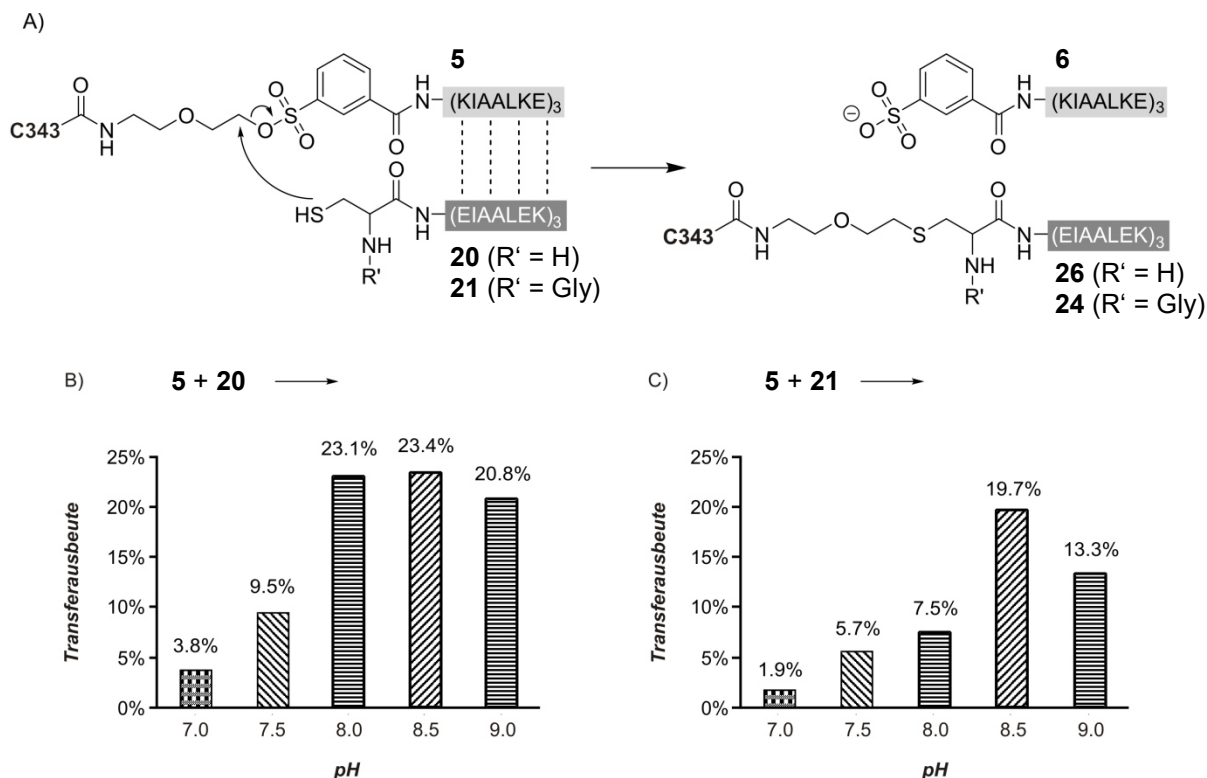
Für die Untersuchung und Quantifizierung molekularer Prozesse in komplexen biologischen Systemen ist die Visualisierung von Proteinen unerlässlich. Auf diese Weise können die Lokalisierung und das dynamische Verhalten eines Proteins sowie die Wechselwirkung mit anderen Proteinen studiert werden. Eine attraktive Markierungsstrategie bietet (I) eine kleine Erkennungssequenz, um den Massenzuwachs am Protein gering zu halten; (II) hohe Selektivität; (III) kurze Markierungszeiten für schnelle biologische Prozesse und/oder *time-lapse*-Experimente; (IV) den Einsatz heller Fluorophore für Einzelmolekülspektroskopie und idealerweise (V) einen modularen Aufbau für die einfache Variation der Reportergruppe.

Die Entdeckung der autofluoreszierenden Proteine revolutionierte die Visualisierung von Proteinen.<sup>[1]</sup> So wie selbst-modifizierende Enzyme – z.B. SNAP,<sup>[3]</sup> CLIP<sup>[4]</sup> oder Halo<sup>[6]</sup> – werden sie genetisch mit dem Zielprotein fusioniert und ermöglichen so eine selektive Proteinmarkierung. Als nachteilig zeichnet sich die Masse aus, die diese Markierungsmethoden dem Zielprotein zufügen. Diese kann sich in der Größenordnung des POIS selbst bewegen. Peptidbasierte Erkennungssequenzen stellen eine attraktive Alternative dazu dar, da sie ebenfalls genetisch kodierbar sind, aber den Massenzuwachs und damit mögliche Beeinflussungen des Zielproteins geringhalten. Peptidtags können zum einen selektiv von Enzymen erkannt und modifiziert werden. Bekannte Beispiele hierfür stellen Biotinligase,<sup>[9]</sup> Phosphopantetheinyltransferase,<sup>[23]</sup> Sortase<sup>[32]</sup> und das Formylglycin-generierende Enzym<sup>[39]</sup> dar. Oftmals benötigen diese Markierungsstrategien jedoch hohe Substratkonzentrationen und/oder lange Reaktionszeiten. Kurze Peptidsequenzen können auch selektiv mit

Metallkomplexen wechselwirken. Eine Pionierarbeit stellt hierbei die Markierung einer Tetracysteinsequenz mittels Organobisarsensonden dar.<sup>[42]</sup> Auch Oligohistidintags werden durch bestimmte Ni(II)<sup>[48]</sup>- und Zn(II)<sup>[54]</sup>-Komplexe selektiv gebunden. Multinukleare Komplexe machen sich den Multivalenzeffekt zunutze und können zum Teil mit subnanomolaren Affinitäten an die entsprechenden Zielsequenzen binden.<sup>[49b, 50]</sup> Trotzdem bleiben die Metallionen-Peptid-Wechselwirkungen nicht-kovalenter Natur. Durch die Anbringung reaktiver Gruppen wurde eine kovalente Verknüpfung zwischen Peptiderkennungssequenz und Reportergruppe erreicht.<sup>[52, 57]</sup> Die Reaktionszeiten der berichteten Systeme sind jedoch langsam. Neben den genannten Wechselwirkungen, können Peptidtags auch durch andere Peptide gebunden werden. Die hochaffinen Wechselwirkungen zwischen artifiziellen E/K-Coiled-Coil-Peptiden wurden von Matsuzaki *et al.* genutzt, um Membranrezeptoren selektiv zu markieren.<sup>[72]</sup> Basierend auf diesen E/K-Peptidtemplaten wurden verschiedene Strategien vorgestellt, um die Reportergruppe kovalent an das Zielprotein zu binden. So stellten Xia *et al.* die Verknüpfung von E- und K-Coils durch die Anbringung eines nukleophilen Cysteinrestes und einer elektrophilen Chloroacetyleinheit vor.<sup>[76]</sup> Auch Matsuzaki *et al.* funktionalisierten das Coiled-Coil-Motiv mit einem Carboxysulfosuccinimid-Linker für die Verknüpfung mittels eines Lysinrests an der Erkennungssequenz.<sup>[77]</sup> Da eine Verknüpfungsreaktion mit einem hohen Massenzuwachs am Zielprotein einhergehen, untersuchten Ball *et al.* die Rhodium-K3-Peptid-katalysierte Übertragung eines Diazosubstrats auf einen Tryptophanrest im E3-Coil.<sup>[74-75]</sup>

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Peptidtemplat-vermittelten Transferreaktionen auf Basis des *de novo* designten E/K-Coiled-Coil-Motives.<sup>[71]</sup> Diese sollten für die selektive Markierung von Proteinen auf lebenden Zellen angewendet werden. Dafür wurde die von Hamachi *et al.* etablierte „Liganden-dirigierte Tosylchemie“<sup>[8a, 106]</sup> in eine Peptidtemplat-vermittelte Alkyltransferreaktion übersetzt. Das K3-Coil wurde dabei mit einem Sulfonat-gebundenen Fluorophor ausgestattet (**5**, Abb. 5.1A). Das E3-Peptid sollte als genetisch kodierbare Erkennungssequenz dienen und wurde für *in vitro* Untersuchungen zum einen mit einem N-terminalen Cystein (**20**) und zum anderen mit einem Glycin-Cystein-Rest (**21**) ausgestattet. Durch Ausbildung des parallelen Coiled-Coil-Motivs kommt die nukleophile Cysteinseitenkette in die räumliche Nähe des Sulfonats und kann dieses in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion angreifen. Dabei wird der Reporterfarbstoff Coumarin 343 (**C343**)

kovalent auf die Erkennungssequenz übertragen. Das verwendete Sulfonat-Konjugat **5** erreichte mit dem terminalen Cystein-E3-Peptid **20** innerhalb von 24 h Reaktionszeit eine Transferausbeute von 23%, bzw. mit dem internen Cystein-E3-Peptid **21** eine Transferausbeute von 7.5% in Phosphatpuffer bei pH 8.0 mit einer Peptidkonzentration von 5  $\mu$ M (Abb. 5.1B und C). In Abwesenheit des Coiled-Motives fand die Transferreaktion nicht statt. So konnte bei der Umsetzung der K3-Thioesterpeptide mit einem Cysteinylopeptid mit randomisierter Sequenz die Bildung eines Acyltransferproduktes nicht beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 8.0 und einer Reduzierung der Peptidkonzentration auf 500 nM waren nach 24 h Reaktionszeit mit beiden Cysteinylopeptiden weniger als 10% Transferausbeute zu beobachten. Die Synthese eines reaktiveren Sulfonatbausteins gelang nicht.

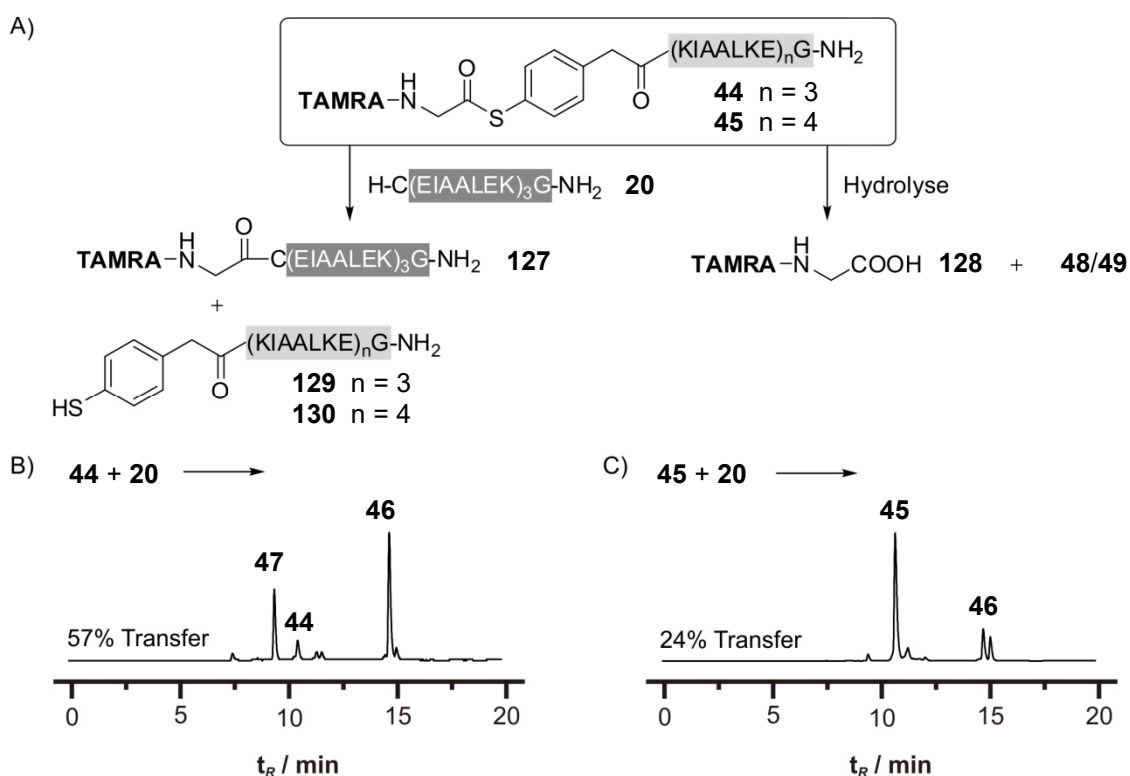


**Abbildung 5.1:** (A) Schema der Peptidtemplat-vermittelten Alkyltransferreaktion. Ausbeuten an Transferprodukt nach 24 h in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung bei Reaktion zwischen Sulfonat-K3-Peptid **5** und (A) dem E3-Peptid mit terminalem Cystein **20** bzw. (B) dem E3-Peptid mit internem Cystein **21**; Bedingungen: 5  $\mu$ M Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, RT.

Für die Untersuchung schneller biologischer Prozesse sind Markierungsstrategien mit kurzen Reaktionszeiten unerlässlich. Aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und Selektivität stellte die von Seitz *et al.* vorgestellte Nukleinsäuretemplat-kontrollierten Acyltransferreaktion eine interessante Alternative dar.<sup>[98]</sup> Die K3- und K4-Coil-Peptide (**44** bzw.



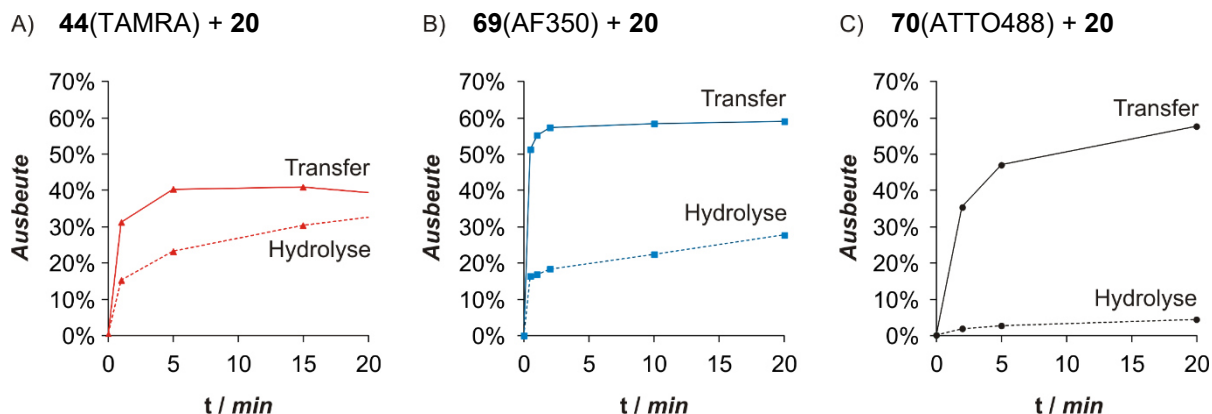
**45**) wurden mit einer als Thioester angebundenen Reportergruppe ausgestattet wurden (Abb. 5.2A). Als Thiollinker diente Mercaptophenylelessigsäure (MPAA), als Reporter der Fluorophor Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA). Bei Ausbildung des Coiled-Coiled-Paares ist die Thiolgruppe des Cysteins in der Lage, in einem reversiblen Thiolaustausch am Thioester anzugreifen und die Reportergruppe auf das POI zu übertragen. Der anschließende, quasi irreversible S→N-Acyltransfer führt zur Bildung einer stabilen Amidbindung. Es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion selektiv ist und in Abwesenheit des Coiled-Coil-Peptides mit Cysteinylopeptiden mit randomisierter Sequenz nicht auftritt. Bei der Inkubation von **20** mit den TAMRA-MPAA-K3- und -K4-Thioesterpeptiden über 30 min in Phosphatpuffer zeigte sich, dass die Reaktion zwischen den gleichlangen Peptiden **44** und **20** eine deutlich höhere Transferausbeute liefert als die zwischen E3 und K4 (Abb. 5.2B+C).



**Abbildung 5.2:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion zwischen den Thioester-K-Peptiden **44/45** und dem Cysteiny-E3-Peptid **20**. FLD-HPLC-Analyse nach 30 min Reaktion zwischen (B) **44** und **20** bzw. (C) **45** und **20**. Bedingungen: 5  $\mu\text{M}$  Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 584 \text{ nm}$ .

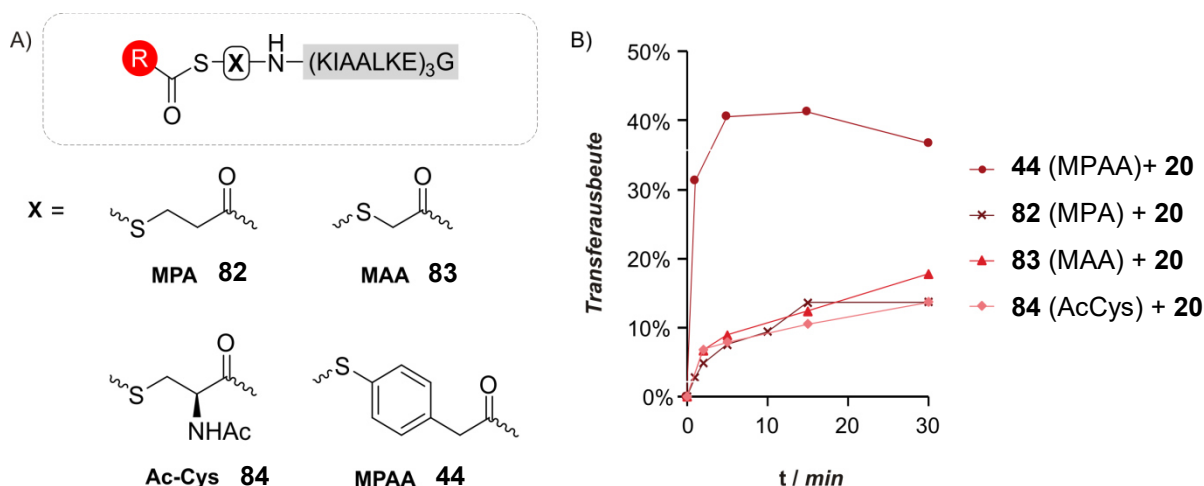
Um die Farbpalette zu erweitern, wurden weitere MPAA-K3-Thioester mit verschiedenen Fluorophoren (AF350, **69** und ATTO488, **70**) dargestellt. Die Untersuchung der Acyltransferreaktion dieser Donorkonjugate mit **20** stellten heraus, (a) dass es sich um eine

überaus schnelle Reaktion handelt, die nach 2 bis 5 min beendet ist, und (b) dass die zu erreichenden Transferausbeuten durch die Hydrolyse der MPAA-Thioester limitiert werden (Abb. 5.3A-C).



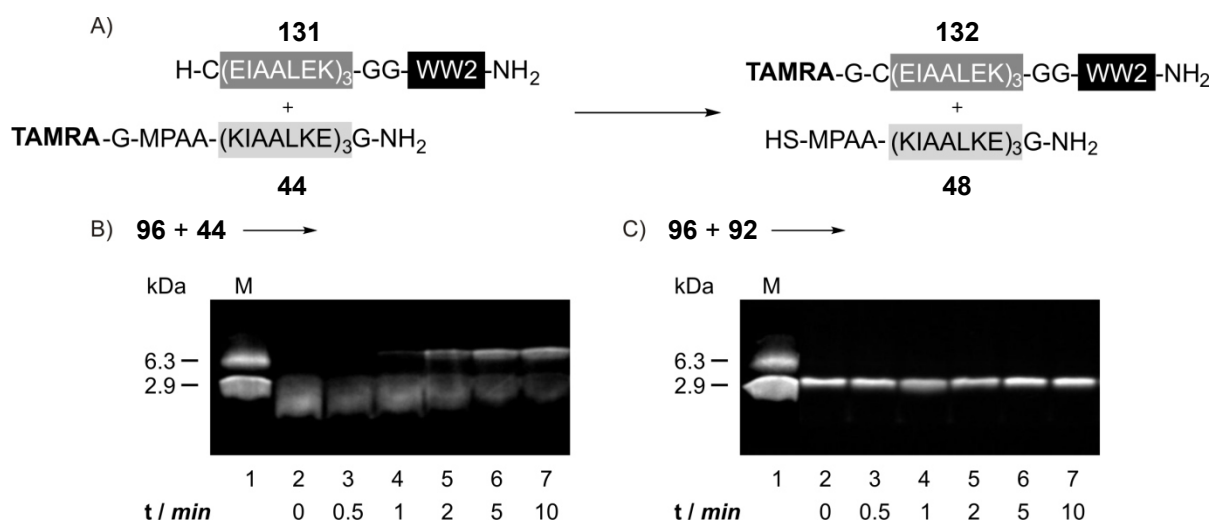
**Abbildung 5.3:** Zeitlicher Verlauf der Transfer- und Hydrolysereaktion während der Markierungsreaktion des Cys-E3-Peptids **20** mit (A) dem TAMRA-K3-Thioester **44**, (B) dem AF350-K3-Thioester **69** und (C) dem ATTO488-K3-Thioester **70**. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Transferausbeuten durch einen Überschuss an Donorpeptid erhöhen lassen. Zudem kann der rasche Abbau von überschüssigen Thioesterpeptiden auch für die Selektivität der Markierungsreaktion in Lebendzellstudien vorteilhaft sein. Für die Anwendung der Acyltransferreaktion in Experimenten mit langer Inkubationsdauer wurde dennoch nach Möglichkeiten gesucht, die Stabilität der Thioester zu erhöhen.



**Abbildung 5.4:** (A) Struktur der Alkylthioester-Konjugate **82** - **84**; (B) zeitlicher Verlauf der Ausbeute der Acyltransferreaktion der Alkylthioester (**82** - **84**) und des Arylthioesters **44** mit dem Cys-E3-Peptid **20**; Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 584$  nm.

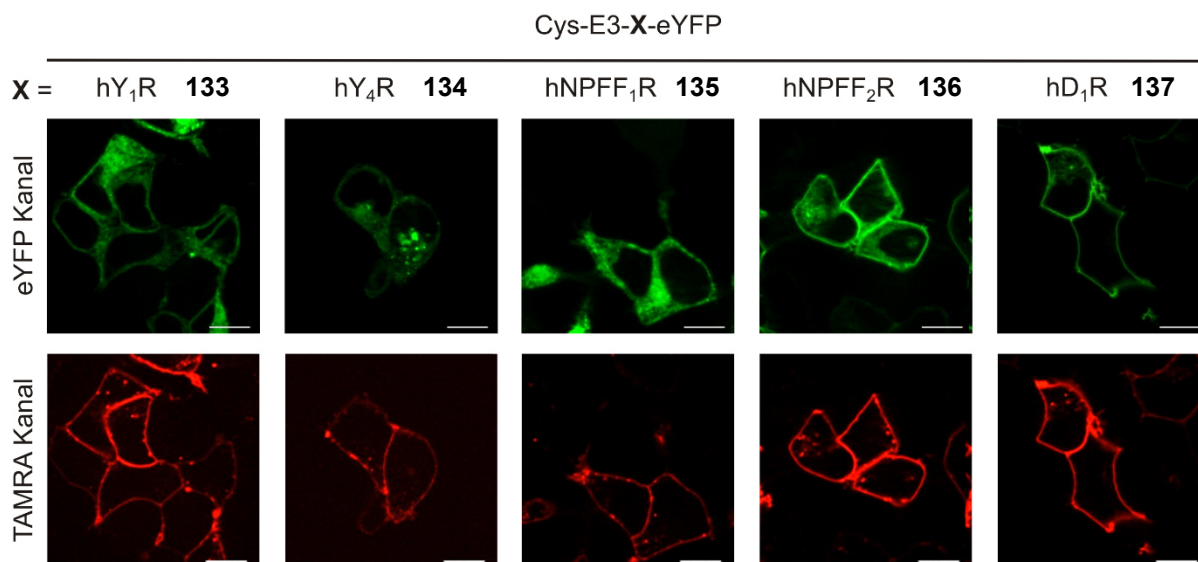
Der Einsatz der in Abbildung 5.4 gezeigten Alkylthiollinker führte neben einer erhöhten Hydrolysestabilität auch zu deutlich langsameren Reaktionsgeschwindigkeiten (vgl. Abb. 5.4B). Nach der Optimierung der Peptidtemplat-vermittelten Acyltransferreaktion wurde diese für die *in vitro* Markierung einer WW2-Proteindomäne angewendet. Die Inkubation des Cys-E3-tragenden Proteins **96** mit zwei Äquivalenten TAMRA-Thioester-Peptid **44** führte zum Erscheinen einer neuen fluoreszierenden Bande in der Gewichtsregion des Transferprodukts in der PAGE-Analyse (Abb. 5.5.B). Bei der Behandlung mit unreaktivem, Amid-gebundenem TAMRA-K3-Peptid (**92**) ist dies nicht der Fall (Abb. 5.5C). Diese Beobachtung unterstreicht die Wichtigkeit einer kovalenten Verknüpfung zwischen Zielprotein und Reportergruppe.



**Abbildung 5.5:** (A) Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion für die Markierung der WW2-Domäne *in vitro*. Fluoreszenz-detektierte SDS-PAGE-Analyse der Reaktion der Cys-E3-tragenden WW2-Domäne mit (B) dem TAMRA-K3-Thioester **44** oder (C) dem TAMRA-K3-Amid **92** (Kontrolle). Markierungsbedingungen: 500 nM Cys-E3-WW2, 1  $\mu$ M K3-Peptid (**44** oder **92**), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7.2.

In Kooperation mit Jonathan Lotze aus dem Arbeitskreis von Prof. Annette Beck-Sickinger (Universität Leipzig) wurde der Peptidtemplat-vermittelte Acyltransfer auch auf die Markierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren angewendet. Nach der genetischen Fusion der Zielproteine mit der N-terminalen Cys-E3-Erkennungssequenz wurden diese transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die C-terminale Fusion mit einem gelbfluoreszierenden Protein (eYFP) bestätigte, dass die Erkennungssequenz die Lokalisation der Rezeptoren nicht beeinträchtigt (Abb. 5.5, obere Reihe). Wie auch der Wildtyp sind die Konstrukte gleichmäßig in die Membran integriert. Es war möglich, sieben verschiedene Rezeptoren durch die Inkubation mit 100 nM Thioester-K3-Peptid (**44** bzw. **70**) fluoreszent

zu markieren. Die Inkubationszeit betrug dabei nur 2 (für **44**) bzw. 5 min (für **70**). Neben der Rezeptorvielfalt wurde auch untersucht, ob die Fusion mit der Erkennungssequenz oder das Markierungsprotokoll die Aktivität des Rezeptors beeinträchtigen. Inositolphosphatakkumulationsassays zeigten, dass es keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die Funktion der untersuchten Proteine gab.



**Abbildung 5.6:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen, die transient mit Cys-E3-HA-hY<sub>1</sub>R-eYFP (**110**), Cys-E3-HA-hY<sub>4</sub>R-eYFP (**111**), Cys-E3-HA-NPFF<sub>1</sub>-eYFP (**112**), Cys-E3-HA-NPFF<sub>2</sub>-eYFP (**113**) oder Cys-E3-HA-hD<sub>1</sub>-eYFP (**114**) transfiziert sind, nach der Inkubation mit dem Markierungsagenz **44**; Markierungsprotokoll: 0.5 mM TCEP, 20 mM HEPES/HBSS, 10 min; 100 nM Peptid **44**, 1% BSA/HBSS, 2 min; dann Austausch der Lösung durch HBSS.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Peptidtemplat-vermittelte Alkyl- und auch Acyltransferreaktion in der Lage sind, eine Reportergruppe selektiv zu übertragen. Dabei zeichnet sich besonders der Acyltransfer durch schnelle Reaktionszeiten auch unter Bedingungen hoher Verdünnung aus. Die modulare Synthese ermöglichte eine einfache Variation der Reportergruppe (z.B. TAMRA, AF350, ATTO488, Biotin). Die genetische Fusion der Erkennungssequenz mit verschiedenen Membranrezeptoren beeinflusste weder die Lokalisation noch Funktion der Zielproteine. Zudem ermöglichte es die hohe Reaktionsgeschwindigkeit, ein komplettes Markierungsprotokoll in weniger als 10 min durchzuführen. Dies macht den Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfer zu einer der schnellsten, kovalenten Markierungsstrategien. Da die genetische Fusion mit dem Cys-E3-Tag für eine große Vielfalt von Membranproteinen möglich ist und auch die Thioester-K3-Peptide synthetisch leicht zugänglich sind, hat diese Methode das Potential einen Weg in die breite Anwendung zur Proteinmarkierung zu finden.

## 5.2 Ausblick

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Peptidtemplat-vermittelte Acyltransferreaktion für die selektive Markierung von Membranproteinen auf lebenden Zellen geeignet ist. Es gelang bisher noch nicht, diese Methode auch auf intrazelluläre Zielproteine anzuwenden. Neben der Transfektion der Zellen mittels Peptidtransfektionsreagenzien oder der *cell squeeze*-Technik,<sup>[121]</sup> wäre auch die Modifizierung der K3-Thioester-Peptide mittels anderer zellpenetrierender Peptide denkbar. So berichteten Cardoso und Hackenberger, dass ein zyklisiertes TAT-Peptid in der Lage ist, ganze Proteine via Transduktion in lebende Zellen zu transportieren. Dabei wurde eine gleichmäßige Verteilung des Cargo in Cytosol und Nukleus statt einer Ansammlung in endozytotischen Vesikeln beobachtet.<sup>[126]</sup> Um die Verfügbarkeit im Cytosol weiter zu erhöhen, wäre die Verknüpfung zwischen Thioester-K3-Peptid und CPP mittels eines in der Zelle spaltbaren Linkers vorteilhaft. Beispiele hierfür stellen sauer spaltbare Verbrückungen (z.B. Hydazonverknüpfung), reduktiv spaltbare Bindungen (z.B. Diazo-Bindungen) oder auch enzymatisch spaltbare Linker (z.B. „GFLG“-Sequenz) dar.<sup>[127]</sup>

Eine ebenso spannende Anwendung des Peptidtemplat-vermittelten Acyltransfers stellen *pulse-chase*-Experimente mit Membranrezeptoren dar. Nach der Markierung der ersten Rezeptorgeneration wird dabei die Internalisierung mancher Rezeptoren durch Inkubation mit dem Liganden initiiert. Um die nächste Generation an Rezeptoren klar von der vorherigen unterscheiden zu können, ist es notwendig, vor dem Labeling mit einer neuen Farbe die „alte“ Markierung von nicht internalisierten Rezeptoren zu entfernen. Eine reversible Modifikation könnte durch einen spaltbaren Linker an der Reportergruppe erreicht werden. Auch hier wäre der Einsatz der o.g. Beispiele denkbar.

# 6 Experimenteller Teil

## 6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

### Chemikalien

Die Fmoc-geschützten Standardamino­säuren wurden von *Iris Biotech* (Marktredwitz, Deutschland) bezogen. Fmoc-Aminosäuren mit supersäurelabilen Schutzgruppen (Fmoc-Lys(Mmt)-OH und Fmoc-Glu(2PhiPr)-OH) wurden bei *NovaBioChem* (Darmstadt, Deutschland) erworben. HCTU und TCEP wurden bei *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) gekauft. TentaGel R RAM Harz wurde über *Rapp Polymere* (Tübingen, Deutschland) erworben. Sieber Amid und NovaSyn TGR Harz wurden bei *NovaBioChem* (Darmstadt, Deutschland) gekauft. TAMRA-COOH wurde über die Firma *ChemPep Inc* (Wellington, USA), AlexaFluor-350-NHS-Ester über *LifeTechnologies* (Darmstadt, Deutschland) und ATTO488-COOH über *ATTO-TEC* (Siegen, Deutschland) bezogen. Trockenes DMF ( $\text{H}_2\text{O} < 150 \text{ ppm}$ ) wurde von *VWR* (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser der Reinheitsstufe Milli-Q-Pore hergestellt. Die Aufbereitung des Wassers erfolgte mit einer Millipore Anlage der Firma *Membrapure* (Hennigsdorf, Deutschland). Für die chromatographischen Methoden wurde Acetonitril mit HPLC-Reinheitsgrad (min. 99.9% Reinheit,  $\text{H}_2\text{O} < 30 \text{ ppm}$ ) der Firma *VWR* (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

### NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente wurden mit einem Gerät der Firma *Bruker* (Billerica, USA) vom Typ *AVANCE DPX 300 MHz* durchgeführt.  $^1\text{H}$ -NMR Spektren wurden auf die Restprotonensignale der Lösungsmittel kalibriert: 7.26 ppm für  $\text{CDCl}_3$ . Die deuterierten Lösungsmittel wurden von der Firma *Deutero* (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in *parts per million* (ppm) angegeben. Die

Spinmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, b = breit.

### Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Hochaufgelöste ESI-Massenspektren wurden mit Spektrometern des Typs *LTQ FT* oder *LTQ FT Ultra* der Firma *Thermo Finnigan* (Waltham, USA) gemessen.

### Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden nach dem Verfahren der Flash-chromatographie durchgeführt. Es wurde Kieselgel der Korngröße 35-70  $\mu\text{m}$  der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung der Laufmittel ist in Volumenverhältnissen angegeben.

### Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Zur Detektion der Substanzen diente UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

### Präparative HPLC

Für die präparative HPLC-Trennung wurde ein Gerät der Serie 1100 der Firma *Agilent* (Santa Clara, USA) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210 \text{ nm}$ . Als Trennsäule diente eine *Polaris 5 C18-A 250 x 10.0 mm* (Porengröße 180 Å) der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug  $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch aus folgenden Komponenten eingesetzt:

A: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA

B: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA

### Analytische HPLC/MS

Für die analytische HPLC/MS wurde ein Gerät der Serie 1100 der Firma *Agilent* (Santa Clara, USA) mit einem VL-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210 \text{ nm}$ . Als Trennsäule diente eine auf  $55^\circ\text{C}$  temperierte *Polaris 5 C18-A 250 x 4.6 mm* (Porengröße 180 Å) der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Als mobile

Phase wurde ein binäres Gemisch in den angegebenen Gradienten aus folgenden Komponenten eingesetzt:

- A: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% Ameisensäure
- B: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% Ameisensäure

### **Fluoreszenz-detektierte HPLC**

Für die Fluoreszenz-detektierte HPLC wurde ein Gerät der Serie *LaChrom Elite* der Firma *Hitachi* (Tokyo, Japan) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Detektors bei den jeweils angegebenen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Als Trennsäule diente eine auf 55°C temperierte *Polaris 5 C18-A 250 x 4.6 mm* (Porengröße 180 Å) der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug 1 mL·min<sup>-1</sup>. Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch in den angegebenen Gradienten aus folgenden Komponenten eingesetzt:

- A: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA
- B: 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA

### **MALDI/TOF-Massenspektrometrie**

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einer *Voyager-DE Biospectrometry Workstation* der Firma *PerSeptive Biosystems* (Framingham, USA) oder einem *AXIMA Confidence* der Firma *Kratos-Shimadzu* (Manchester, UK) im positiven Modus aufgenommen. Als Matrix für die Messungen diente eine Lösung aus 0.1 M 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Wasser/Acetonitril/TFA (50:50:0.1).

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Es wurde ein *Carey Eclipse* Gerät der Firma *Varian* (Palo Alto, USA) verwendet. Die Messungen wurden bei 25°C in 150 µL-Küvetten mit einer Schichtdicke  $d = 1$  cm der Firma *Hellma* (Müllheim, Deutschland) durchgeführt. Die Anregungs- und Emissionsfilterschlitzbreiten waren jeweils auf  $\pm 5$  nm und die Spannung des Photomultiplier-Detektors auf „Medium“ eingestellt.



## 6.2 Allgemeine Syntheseprotokolle

### Automatisierte Synthese nach der Fmoc-Strategie

Festphasensynthesen mit Ansatzgrößen bis 5  $\mu\text{mol}$  wurden an einem *ResPep* Synthesizer von *Intavis* (Köln, Deutschland) in Mikroreaktoren durchgeführt, die mit Teflonfritten ausgestattet waren. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

*Fmoc-Abspaltung:* Das Harz wurde 2 min mit DMF/Piperidin (4:1, 200  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurde es erneut über 5 min mit DMF/Piperidin (4:1, 200  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (3x 200  $\mu\text{L}$  DMF).

*Kupplung:* In einem Voraktivierungsgefäß wurden eine 0.6 M HCTU Lösung in NMP (5.4 Äq.), eine 4 M NMM Lösung in DMF (12 Äq.) und die 0.3 M Aminosäurelösung in NMP (6 Äq.) gemischt. Nach 8 min wurde die Lösung auf das Harz überführt. Nach 45 min wurde das Harz gewaschen (2x 200  $\mu\text{L}$  DMF). Ab der 10. Aminosäure wurde dieser Kupplungsschritt ein zweites Mal wiederholt.

*Capping:* Das Harz wurde mit  $\text{Ac}_2\text{O}$ /2,6-Lutidin/DMF (5:6:89, 200  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Nach 5 min wurde das Harz gewaschen (2x 200  $\mu\text{L}$  DMF).

Festphasensynthesen mit Ansatzgrößen ab 10  $\mu\text{mol}$  erfolgten an einem *MultiPep RS* Synthesizer von *Intavis* (Köln, Deutschland) in 3 mL Polypropylen-Spritzenreaktoren, die mit Teflonfritten ausgestattet waren. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

*Fmoc-Abspaltung:* Das Harz wurde 2 min mit DMF/Piperidin (4:1, 800  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurde es erneut über 5 min mit DMF/Piperidin (4:1, 800  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x 800  $\mu\text{L}$  DMF).

*Kupplung:* In einem Voraktivierungsgefäß wurden eine 0.6 M HCTU Lösung in NMP (5.4 Äq.), eine 4 M NMM Lösung in DMF (12 Äq.) und die 0.3 M Aminosäurelösung in NMP (6 Äq.) gemischt. Nach 8 min wurde die Lösung auf das Harz überführt. Nach 45 min wurde das Harz gewaschen (3x 800  $\mu\text{L}$  DMF). Ab der 10. Aminosäure wurde dieser Kupplungsschritt ein zweites Mal wiederholt.

*Capping:* Das Harz wurde mit  $\text{Ac}_2\text{O}$ /2,6-Lutidin/DMF (5:6:89, 800  $\mu\text{L}$ ) behandelt. Nach 10 min wurde das Harz gewaschen (4x 800  $\mu\text{L}$  DMF).

### Manuelle Festphasensynthese

Für manuelle Kupplungsschritte wurde das Harz in 3 mL Polypropylen-Spritzenreaktoren mit Teflonfritte und Teflonstempel überführt. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### Abspaltung vom Sieber-Amid-Harz

Zum Quellen wurde das Harz in einem 2 mL-PP-Spritzenreaktor über 10 min mit  $\text{CHCl}_3$  behandelt. Das Harz wurde dann über 2 min mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}/\text{TIS}$  (96:2:2, 0.5 mL) geschüttelt. Das Filtrat wurde in 5 mL MeCN gegeben und das Harz noch mit je 0.5 mL MeCN und  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (1:1) gewaschen. Die Lösungsmittel der vereinigten Acetonitrilphasen wurden durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (50:50) aufgenommen

### Abspaltung vom Rink-Amid-Harz

Das Harz wurde in einem 2 mL-PP-Spritzenreaktor mit  $\text{CHCl}_3$  gewaschen und im Vakuum getrocknet. Dann wurde das Harz über 1.5 h mit  $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$  (96:2:2, 0.5 mL) geschüttelt. Anschließend wurde das Harz erneut mit 0.5 mL TFA gewaschen. Die vereinigten TFA-Phasen wurden in 10 mL gekühlten Diethylether gegeben. Der Niederschlag wurde durch Ultrazentrifugation (4000 Runden·min<sup>-1</sup> über 20 min) gesammelt und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde im Luftstrom getrocknet (für Cysteinylpeptide im Ar-Strom) und in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$  (50:50:0.1) aufgenommen.

### Reinigung von Peptiden und Peptid-Konjugaten

Die Rohprodukte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt. Anschließend wurden die Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser mit 1% TFA aufgenommen und die Identität bzw. Reinheit des Produkts mittels analytischer HPLC/MS und/oder MALDI-TOF-MS überprüft.

### Konzentrationsbestimmung von Peptiden und Peptid-Konjugaten

Die optische Dichte der wässrigen Peptidlösungen wurde an einem *NanoDrop ND-1000* Photospektrometer der Firma *Thermo Scientific* (Waltham, USA) gemessen (bei 555 nm für TAMRA-tragende Konjugate:  $\epsilon = 95\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , bei 500 nm für ATTO488-tragende Konjugate:  $\epsilon = 90\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , bei 445 nm für C343-tragende Konjugate:  $\epsilon = 44\,300\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , bei 346 nm für AF350-tragende Konjugate:  $\epsilon = 19\,000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , bei

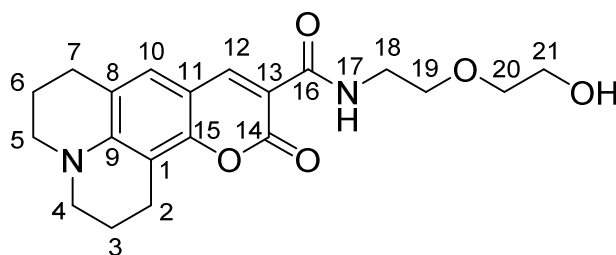
---

280 nm für Verbindung **23** und **96**). Für Peptide, die kaum Absorption jenseits des UV-Bereichs haben, wurde der Extinktionskoeffizient bei 214 nm  $\epsilon_{214}$  nach einer Methode von Gruppen *et al.*<sup>[128]</sup> bestimmt (Verbindung **20**, **21**, **50**, **52**, **59**, **60**, **61**, (**44** , **102**, **104** und **106**). Ein Aliquot der wässrigen Lösungen wurde mit Phosphatpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) auf 150  $\mu$ L verdünnt und die optische Dichte bei 214 nm an einem *SmartSpec Plus* Photospektrometer der Firma *Bio-Rad* (Hercules, USA) bestimmt.

### 6.3 Versuche zur Alkyltransferreaktion

Aminosäuresequenzen werden mit dem Einbuchstabenkode abgekürzt. Nicht proteinogene Bestandteile der Konjugate werden entweder ausgeschrieben oder durch Unterstreichung kenntlich gemacht.

#### ***N*-(2-Ethoxyethanol)-11-oxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin-10-amid (12)**



Zu einer Lösung aus 1 Äq. Coumarin 343 (50 mg, 175  $\mu\text{mol}$ ) in 0.7 mL trockenem DMF wurden 2 Äq. Hydroxybenzotriazol (47 mg, 350  $\mu\text{mol}$ ), 1.1 Äq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid Hydrochlorid (37 mg, 193  $\mu\text{mol}$ ) und 2 Äq. Diisopropylethylamin (59.5  $\mu\text{L}$ , 350  $\mu\text{mol}$ ) gegeben. Nach fünf Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden der Reaktionslösung 1.5 Äq. 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (26.3  $\mu\text{L}$ , 263  $\mu\text{mol}$ ) hinzugefügt. Die Lösung wurde über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde der Rückstand in 2 mL  $\text{CHCl}_3$  aufgenommen und dreimal mit je 2 mL gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde **12** als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 60 mg (161  $\mu\text{mol}$ , 92%).

$R_f = 0.50$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (20:1) + 0.1% Ameisensäure).

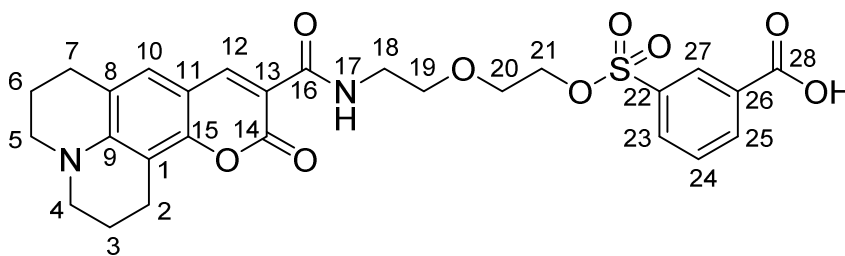
$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$  (372.42  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

HRMS ( $m/z$ ): ber. für  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 373.1763, gef.: 373.1759.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.97 (t, 4H; 3-, 6- $\text{CH}_2$ ), 2.76 – 2.87 (m, 4H; 2-, 7- $\text{CH}_2$ ), 3.32 (m, 4H; 4 – 5- $\text{CH}_2$ ), 3.66 (m, 6H; 19 – 21- $\text{CH}_2$ ), 3.76 (m, 2H; 8- $\text{CH}_2$ ), 7.00 (s, 1H; 10- $\text{CH}$ ), 8.59 (s, 1H; 12- $\text{CH}$ ), 9.16 (s, 1H; 17- $\text{NH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 20.3 und 21.1 (2-, 3-, 6 $\text{CH}_2$ ), 27.5 (7- $\text{CH}_2$ ), 39.2 (18- $\text{CH}_2$ ), 50.2 (4 – 5- $\text{CH}_2$ ), 61.9, 69.8 und 69.9 (19 – 21- $\text{CH}_2$ ), 108.1, 112.2, 117.7, 119.4, 119.7, 123.5 und 127.0 (1-, 8-, 9-, 11-, 13- $\text{C}$ , 10-, 12- $\text{CH}$ ), 145.8, 148.1 und 153.3 (15- $\text{C-O}$ , 14-, 16- $\text{C=O}$ ).

**2-(11-Oxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin-10-amido)ethoxyethyl-3-benzoylsulfonsäureester (13)**



Zu einer Lösung aus 2 Äq. 3-(Chlorosulfonyl)benzoesäure (60 mg, 269  $\mu\text{mol}$ ) in 1.5 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde bei  $0^\circ\text{C}$  langsam eine Lösung aus 1 Äq. **12** (50 mg, 134  $\mu\text{mol}$ ) in 0.5 mL trockenem Pyridin gegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung durch Zugabe von 460  $\mu\text{L}$  Essigsäure neutralisiert. Das Produkt wurde mit 10 mL  $\text{CHCl}_3$  aus der Reaktionslösung extrahiert und die organische Phase anschließend mit 10 mL einer ges.  $\text{NaHSO}_4$ -Lösung gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde **13** als amorpher, gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 20 mg (36  $\mu\text{mol}$ , 27%).

$R_f = 0.47$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (15:1)).

$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$  (556.59  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

HRMS ( $m/z$ ): ber. für  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 557.1593, gef.: 557.1589.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.96 (m, 4H; 3-, 6- $\text{CH}_2$ ), 2.76 – 2.87 (m, 4H; 2-, 7- $\text{CH}_2$ ), 3.31 (m, 4H; 4-, 5- $\text{CH}_2$ ), 3.64 – 3.75 (m, 8H; 18 – 21- $\text{CH}_2$ ), 6.99 und 7.35 – 9.26 (m, 6H; 10-CH, 12-NH, 17-, 23 – 25-, 27-CH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 19.0 und 20.0 (2-,3-, 6 $\text{CH}_2$ ), 26.4 und 28.7 (6-, 7- $\text{CH}_2$ ), 48.8 und 49.2 (4 – 5- $\text{CH}_2$ ), 63.2, 67.9, 69.0 und 71.5 (18 – 21- $\text{CH}_2$ ), 126.1, 127.0, 127.4, 129.5, 129.6 und 147.1 (10-, 12-, 23 – 25-, 27-CH).

**C343-Aminoethoxyethylsulfonat-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (5)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie mit supersäurelabilen permanenten Schutzgruppen als 1  $\mu\text{mol}$  Ansatz am Sieber-Amid-Harz (4.0 mg, 0.25 mmol/g) synthetisiert. Nach der Fmoc-Entschützung mittels Piperidin/DMF (1:4, 2  $\times$  1.5 min) wurden 4 Äq. **13** (Endkonzentration 0.4 M in DMF), 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM hinzugefügt. Nach 45 min Reaktionszeit wurde das Harz

gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 6 nmol, 1%.

C<sub>134</sub>H<sub>211</sub>N<sub>31</sub>O<sub>36</sub>S (2864.35 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 12.1 min (20% B – 60% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+3H]<sup>3+</sup>: 955.9 (ber.: 955.8), [M+4H]<sup>4+</sup>: 717.5 (ber.: 717.1), [M+5H]<sup>5+</sup>: 573.8 (ber.: 573.9), [M+6H]<sup>6+</sup>: 478.8 (ber.: 478.4).

### **H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (20)**

Die Peptidsequenz C(EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am NovaSyn TGR Harz (8.0 mg, 0.25 mmol/g) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 247 nmol, 25%.

C<sub>107</sub>H<sub>185</sub>N<sub>27</sub>O<sub>35</sub>S (2441.83 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 13.5 min (03% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+3H]<sup>3+</sup>: 814.8 (ber.: 814.9), [M+4H]<sup>4+</sup>: 611.6 (ber.: 611.5).

### **H-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (21)**

Die Peptidsequenz GC(EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 1 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

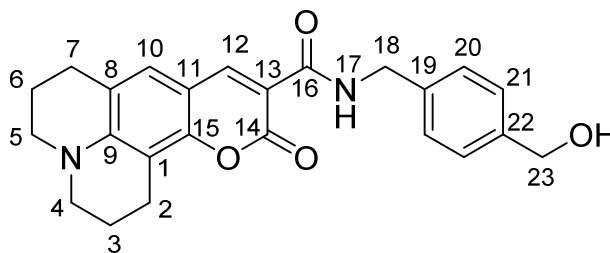
Ausbeute: 458 nmol, 46%.

C<sub>109</sub>H<sub>188</sub>N<sub>28</sub>O<sub>36</sub>S (2498.88 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 9.3 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1251.1 (ber.: 1251.0), [M+3H]<sup>3+</sup>: 834.2 (ber.: 834.3), [M+4H]<sup>4+</sup>: 625.8 (ber.: 626.0).

***N*-(3-(Hydroxymethyl)benzyl)-11-oxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin - 10-amid (28)**



Zu einer Lösung aus 1 Äq. Coumarin 343 (50 mg, 175  $\mu\text{mol}$ ) in 1 mL trockenem DMF wurden 2 Äq. Hydroxybenzotriazol (47 mg, 350  $\mu\text{mol}$ ), 1.2 Äq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid Hydrochlorid (41 mg, 210  $\mu\text{mol}$ ) und 2 Äq. Diisopropylethylamin (59.5  $\mu\text{L}$ , 350  $\mu\text{mol}$ ) gegeben. Nach fünf Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden der Reaktionslösung 1.5 Äq. 3-(Aminomethyl)phenylmethanol (36.1 mg, 263  $\mu\text{mol}$ ) hinzugefügt. Die Lösung wurde über 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurde der Rückstand in 1 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (20:1)). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde **28** als gelber, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 45 mg (161  $\mu\text{mol}$ , 92%).

$R_f = 0.35$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (20:1)).

$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$  (404.47  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

HRMS ( $m/z$ ): ber. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 405.1814, gef.: 405.1810.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.00 (m, 4H; 3-, 6- $\text{CH}_2$ ), 2.79 + 2.90 (m, 4H; 2-, 7- $\text{CH}_2$ ), 3.35 (m, 4H; 4 – 5- $\text{CH}_2$ ), 4.67 (m, 2H; 18- $\text{CH}_2$ ), 7.03 (s, 1H; 10- $\text{CH}$ ), 7.36 (m, 4H; 20 – 21- $\text{CH}$ ), 8.65 (s, 1H; 12- $\text{CH}$ ), 9.30 (b, 1H; 17-NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 20.1 und 21.2 (2-, 3-, 6-, 7- $\text{CH}_2$ ), 43.3 (18- $\text{CH}_2$ ), 49.8 und 50.0 (4 – 5- $\text{CH}_2$ ), 65.0 (23- $\text{CH}_2$ ), 125.7, 127.0, 127.7, 128.5 (10-, 12-, 20 – 21- $\text{CH}$ ).

### Verfolgung der Alkyltransferreaktion

Der Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP) wurde entgast und der angegebene pH-Wert durch Zugabe von 2 M Natronlauge eingestellt. Wässrige Stammlösungen der Peptide wurden dem Puffer zugegeben, sodass ein Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  und die angegebenen Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$  bzw. 0.5  $\mu\text{M}$ ) erreicht wurden, und mittels Pipette durchmischt.

Aliquote, die 50 pmol Peptid enthalten, wurden nach den angegebenen Reaktionszeiten entnommen und die Reaktion mittels HPLC untersucht. Die Detektion der Signale erfolgte im Fluoreszenzmodus bei den Fluorophor-spezifischen Wellenlängen (C343:  $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$ ).



## 6.4 Versuche zur Acyltransferreaktion

### TAMRA-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (44)

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 10 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (52.6 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 1 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPAA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 1.5 µmol, 15%.

C<sub>142</sub>H<sub>224</sub>N<sub>32</sub>O<sub>34</sub>S (2955.55 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 14.7 min (20% B – 60% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> = 2955.8 (ber.: 2956.5).

### TAMRA-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>4</sub>G-NH<sub>2</sub> (45)

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>4</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 1 µmol Ansatz am NovaSyn TGR Harz (4.0 mg, 0.25 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 1 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPAA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM versetzt über 45 min und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10

min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 14 nmol, 1%.

C<sub>177</sub>H<sub>287</sub>N<sub>41</sub>O<sub>43</sub>S (3710.48 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 15.7 min (3% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> = 3712.7 (ber.: 3711.5).

#### **H-A(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (50)**

Die Peptidsequenz A(EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (2 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 379 nmol, 38%.

C<sub>107</sub>H<sub>185</sub>N<sub>27</sub>O<sub>35</sub> (2409.77 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 10.4 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1206.0 (ber.: 1205.9), [M+3H]<sup>3+</sup>: 804.3 (ber.: 804.3), [M+4H]<sup>4+</sup>: 603.4 (ber.: 603.5).

#### **H-(EIAALEK)<sub>3</sub>K(Cys)-NH<sub>2</sub> (52)**

Die Aminosäure Fmoc-Lys(Mmt)-OH wurde als 2 µmol Ansatz an das TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) gekuppelt. Die Peptidsequenz (EIAALEK)<sub>3</sub> wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie synthetisiert. Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Fmoc-Cys(Trt)-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU, 4 Äq. HOBt und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt und dann (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Das Harz wurde mit

DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und abschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 83.0 nmol, 4%.

C<sub>105</sub>H<sub>182</sub>N<sub>26</sub>O<sub>34</sub>S (2384.78 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 15.9 min (20% B – 60% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2386.3 Da (ber.: 2385.8 Da).

#### **H-G<sub>2</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (59)**

Die Peptidsequenz GGC(EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 1 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 336 nmol, 34%.

C<sub>111</sub>H<sub>191</sub>N<sub>29</sub>O<sub>37</sub>S (2555.93 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 9.5 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1278.8 (ber.: 1279.0), [M+3H]<sup>3+</sup>: 852.8 (ber.: 853.0), [M+4H]<sup>4+</sup>: 639.9 (ber.: 640.0).

#### **H-G<sub>3</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (60)**

Die Synthese von **60** erfolgte analog zu Verbindung **59** als 1 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g).

Ausbeute: 296 nmol, 30%.

C<sub>113</sub>H<sub>194</sub>N<sub>30</sub>O<sub>38</sub>S (2612.98 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 10.0 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+2H]<sup>2+</sup>: 1307.1 (ber.: 1307.5), [M+3H]<sup>3+</sup>: 871.8 (ber.: 872.0), [M+4H]<sup>4+</sup>: 654.1 (ber.: 654.3).

#### **H-G<sub>4</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (61)**

Die Synthese von **61** erfolgte analog zu Verbindung **59** als 1 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g).

Ausbeute: 103 nmol, 10%.

$C_{115}H_{197}N_{31}O_{39}S$  (2670.04 Da).

HPLC:  $t_R$  = 10.3 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 891.2 (ber.: 891.0),  $[M+4H]^{4+}$ : 668.5 (ber.: 668.5),  $[M+5H]^{5+}$ : 535.1 (ber.: 535.0).

#### **AF350-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (69)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 1 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPAA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. AF350-Succinimidylester (Endkonzentration 0.5 M in DMF) und 4 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 79 nmol, 8%.

$C_{129}H_{213}N_{31}O_{36}S_2$  (2838.4 Da).

HPLC:  $t_R$  = 15.1 min (20% B – 60% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 946.8 (ber.: 947.1),  $[M+4H]^{4+}$ : 710.6 (ber.: 710.6),  $[M+5H]^{5+}$ : 568.6 (ber.: 568.7).

#### **ATTO488-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (70)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 1 mL)

behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPAA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 0.6 Äq. ATTO488-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 0.6 Äq. PPTS, 0.6 Äq. HCTU und 1.8 Äq. DIPEA über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 0.9 µmol, 15% (Die Ausbeute wird auf ATTO488-OH bezogen, da dieser Reaktand in der Acylierungsreaktion im Unterschuss eingesetzt wurde).

C<sub>140</sub>H<sub>221</sub>N<sub>32</sub>NaO<sub>38</sub>S<sub>3</sub> (3079.62 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 9.5 min (20% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> = 3084.7 (ber.: 3080.6 Da).

#### **AF350-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (71)**

Die Peptidsequenz GC(EIAALEK)<sub>3</sub>G<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Der anschließende manuelle Syntheseschritt erfolgte mit einem Aliquot (1 µmol) des Harzes. Das Aliquot wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF) wurden 4 Äq. AF350-Succinimidylester (Endkonzentration 0.05 M in DMF) und 4 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 84.8 nmol, 8.5 %.

C<sub>121</sub>H<sub>197</sub>N<sub>29</sub>O<sub>42</sub>S<sub>2</sub> (2794.15 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 15.0 min (20% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2795.7 (ber.: 2795.2).

**H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>K(C343)-NH<sub>2</sub> (75)**

Die Peptidsequenz (EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 12.3 nmol, 1%.

C<sub>121</sub>H<sub>195</sub>N<sub>27</sub>O<sub>37</sub>S (2652.06 Da)

HPLC: t<sub>R</sub> = 12.2 min (20% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2653.4 (ber.: 2653.1).

**TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (82)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 38 nmol, 4%.

C<sub>137</sub>H<sub>222</sub>N<sub>32</sub>O<sub>34</sub>S (2893.48 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 10.4 min (3% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2894.4 (ber.: 2894.5).

**TAMRA-G-MAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (83)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MAA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 12 nmol, 1%.

C<sub>136</sub>H<sub>220</sub>N<sub>32</sub>O<sub>34</sub>S (2879.45 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 11.0 min (3% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2880.8 (ber.: 2880.5).

**N-Ac-Cys(TAMRA-Gly)-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (84)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. S-Mmt-N-Ac-Cys-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz

mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 15 nmol, 2%.

C<sub>139</sub>H<sub>225</sub>N<sub>33</sub>O<sub>35</sub>S (2950.53 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 10.9 min (3% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2957.9 (ber.: 2951.5).

#### **H-(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (85)**

Die Peptidsequenz (EIAALEK)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Ein Aliquot (400 nmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 72 nmol, 19%.

C<sub>104</sub>H<sub>180</sub>N<sub>26</sub>O<sub>34</sub> (2338.69 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 16.1 min (03% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 2341.2 Da (ber.: 2339.7 Da).

#### **TAMRA-G-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (92)**

Die Peptidsequenz G(KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1 µmol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 271 nmol, 27.1 %.



$C_{134}H_{218}N_{32}O_{33}$  (2805.35 Da).

HPLC:  $t_R$  = 10.2 min (20% B – 80% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 946.8 (ber.: 947.1),  $[M+4H]^{4+}$ : 710.6 (ber.: 710.6),  $[M+5H]^{5+}$ : 568.6 (ber.: 568.7).

#### **TAMRA-G-(KIAALKE)<sub>3</sub>(F<sup>NO2</sup>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (95)**

Die Peptidsequenz G(KIAALKE)<sub>3</sub>(F<sup>NO2</sup>)<sub>4</sub> wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 17.2 nmol, 1%.

$C_{168}H_{247}N_{32}O_{47}$  (3466.94 Da).

HPLC:  $t_R$  = 13.7 min (20% B – 80% B in 20 min).

MALDI-TOF-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 3469.2 Da (ber.: 3467.9 Da).

#### **Verfolgung der Acyltransferreaktion**

Der Puffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP) wurde entgast und durch Zugabe von 2 M Natronlauge ein pH-Wert von 7.0 eingestellt. Wässrige Stammlösungen der Peptide wurden dem Puffer zugegeben, sodass ein Endvolumen von 100  $\mu$ L und die angegebenen Konzentrationen (5  $\mu$ M bzw. 0.5  $\mu$ M) erreicht wurden, und mittels Pipette durchmischt. Aliquote, die 50 pmol Peptid enthalten, wurden nach den angegebenen Reaktionszeiten entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 2vol% TFA gestoppt. Die Analyse erfolgte mittels HPLC im Fluoreszenzmodus bei den Fluorophor-spezifischen Wellenlängen (TAMRA:  $\lambda_{Ex}$  = 555 nm,  $\lambda_{Em}$  = 584 nm; AF350:  $\lambda_{Ex}$  = 346 nm,  $\lambda_{Em}$  = 442 nm; ATTO488:  $\lambda_{Ex}$  = 501 nm,  $\lambda_{Em}$  = 523 nm).

**Bestimmung der Thioesterstabilität in Lösung**

Die Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  oder HBSS) wurden entgast und durch Zugabe von 2 M Natronlauge ein pH-Wert von 7.0 eingestellt. Wässrige Stammlösungen der Thioesterpeptide (**44** bzw. **84**) wurden dem Puffer zugegeben, sodass ein Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  und eine Konzentrationen von 0.5  $\mu\text{M}$  erreicht wurde, und mittels Pipette durchmischt. Aliquote, die 50 pmol Peptid enthalten, wurden nach den angegebenen Reaktionszeiten entnommen und unmittelbar mittels analytischer HPLC im Fluoreszenzmodus bei den Fluorophor-spezifischen Wellenlängen (TAMRA:  $\lambda_{\text{Ex}} = 555 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 584 \text{ nm}$ ) untersucht.

## 6.5 Versuche zur Proteinmarkierung *in vitro*

### **H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>-GG-WW2-NH<sub>2</sub> (96)**

Die Peptidsequenz C(EIAALEK)<sub>3</sub> GG WVEGL SEDGF TYYYN TETGE SRWEK PDDG wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (26.3 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt. Nach der Reinigung wurde das Produkt in Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) gelöst statt in Wasser.

Ausbeute: 13.5 nmol, 0.3 %.

C<sub>260</sub>H<sub>391</sub>N<sub>63</sub>O<sub>89</sub>S (5855.30 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 12.3 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+4H]<sup>4+</sup>: 1464.3 (ber.: 1464.8), [M+5H]<sup>5+</sup>: 1171.8 (ber.: 1172.1), [M+6H]<sup>6+</sup>: 976.8 (ber.: 976.9), [M+7H]<sup>7+</sup>: 837.6 (ber.: 837.5).

### **TAMRA-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>-GG-WW2-NH<sub>2</sub> (97)**

Die Peptidsequenz GC(EIAALEK)<sub>3</sub> GG WVEGL SEDGF TYYYN TETGE SRWEK PDDG wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (26.3 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Nach der Behandlung mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Anschließend wurde das Harz in einem manuellen Kupplungsschritt mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Das Produkt wurde vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt. Nach der Reinigung wurde das Produkt in Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) gelöst statt in Wasser.

Ausbeute: 5.8 nmol.

C<sub>289</sub>H<sub>417</sub>N<sub>67</sub>O<sub>95</sub>S (6381.84 Da.)

HPLC: t<sub>R</sub> = 10.4 min (20% B – 90% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+4H]^{4+}$ : 1596.3 (ber.: 1596.5),  $[M+5H]^{5+}$ : 1277.1 (ber.: 1277.4),  $[M+6H]^{6+}$ : 1064.6 (ber.: 1064.6),  $[M+7H]^{7+}$ : 912.7 (ber.: 912.7),  $[M+8H]^{8+}$ : 798.6 (ber.: 798.7).

#### **Biotin-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (102)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1  $\mu$ mol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. *S*-Mmt-*N*-Ac-Cys-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min versetzt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidine/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. Biotin (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 176.2 nmol, 17.6 %.

C<sub>125</sub>H<sub>215</sub>N<sub>31</sub>O<sub>31</sub>S<sub>2</sub> (2712.36 Da).

HPLC:  $t_R$  = 9.2 min (20% B – 80% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+3H]^{3+}$ : 904.9 (ber.: 905.1),  $[M+4H]^{4+}$ : 679.0 (ber.: 679.1),  $[M+5H]^{5+}$ : 543.4 (ber.: 543.5),  $[M+6H]^{6+}$ : 453.0 (ber.: 453.1).

#### **Biotin-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (104)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>G wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 2  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (10.5 mg, 0.19 mmol/mg) synthetisiert. Ein Aliquot (1  $\mu$ mol) wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). In einem manuellen Kupplungsschritt wurden dann 4 Äq. Biotin (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 156 nmol, 15.6 %.

$C_{117}H_{209}N_{31}O_{30}S$  (2562.16 Da).

HPLC:  $t_R$  = 8.9 min (20% B – 60% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+4H]^{4+}$ : 641.6 (ber.: 641.5),  $[M+5H]^{5+}$ : 513.6 (ber.: 513.4),  $[M+6H]^{6+}$ : 428.2 (ber.: 428.0).

### **Biotin-MPAA-NH<sub>2</sub> (106)**

Die Synthese wurde manuell als 1  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/mg) durchgeführt. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 0.5 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x  $CH_2Cl_2$ , 5x DMF). Nach der Kupplung von 4.5 Äq. Mmt-MPAA-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 4 Äq. HCTU, und 8 Äq. NMM über 45 min wurde der Schritt ein zweites Mal wiederholt. Nach einem Waschschrift (5x DMF, 5x  $CH_2Cl_2$ , 5x DMF) wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidin/ $Ac_2O$  (89:6:5) über 10 min behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x  $CH_2Cl_2$ ). Nach der Mmt-Entschützung mittels  $CH_2Cl_2$ /TFA/TIS (96:2:2) über zweimal 1 min wurden 4 Äq. Biotin (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x  $CH_2Cl_2$ ) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 836  $\mu$ mol, 83.6 %.

$C_{18}H_{23}N_3O_3S_2$  (393.52 Da).

HPLC:  $t_R$  = 10.4 min (20% B – 60% B in 20 min).

ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$ : 394.3 Da (ber.: 394.5 Da).

### **Versuche zur Markierung der WW2-Domäne**

Der Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.8 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM TCEP) wurde entgast und durch Zugabe von 2 M NaOH Lösung ein pH-Wert von 7.2 eingestellt. Wässrige Stammlösungen der Peptide wurden dem Puffer zugegeben, sodass ein Endvolumen von 100  $\mu$ L und die angegebenen Konzentrationen erreicht wurden (**44**:  $c_{Stock}$  = 126.3  $\mu$ M, 0.792  $\mu$ L zugegeben für 1  $\mu$ M Endkonzentration; **92**:  $c_{Stock}$  = 95.0  $\mu$ M, 1.053  $\mu$ L

zugegeben für 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration; **96**:  $c_{\text{Stock}} = 67.3 \mu\text{M}$ , 0.743  $\mu\text{L}$  zugegeben für 0.5  $\mu\text{M}$  Endkonzentration). 15  $\mu\text{L}$  Aliquote wurden nach den angegebenen Reaktionszeiten entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  TFA gestoppt.

### Gelelektrophorese

Für die Untersuchung der Transferreaktion an der WW2-Domäne wurde ein 16%iges SDS-Page-Gel mit 6M Harnstoff verwendet. Es wurde nach einer Vorschrift von Schägger<sup>[129]</sup> präpariert.

Nach dem Gießen des Trenngels (ca. 5 mL) wurde es mit 1 mL des Spacergels überschichtet. Dieses wurde mit Methanol überschichtet. Nach beendeter Polymerisation wurde das Methanol entfernt, die Oberfläche des Gels getrocknet und das Sammelgel (ca. 1mL) aufgesetzt. Nach der Polymerisation wurden die Taschen des Gels mit Gelpuffer gewaschen. Zum Beladen wurden 15  $\mu\text{L}$  Probe mit 5  $\mu\text{L}$  Beladungspuffer (4-fach konzentriert) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden 10  $\mu\text{L}$  auf das Gel aufgetragen. Als Massenvergleich wurde außerdem das Transferprodukt 97 und das TAMRA-K3-Amid 92 aufgetragen. Mittels eines Geräts des Typs *Mini-Protean II* der Firma *Bio-Rad* (Hercules, USA) wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V über 60 min bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit einem Bildgebungsgerät des Typs *4000MM PRO* der Firma *Kodak* (Rochester, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm analysiert.

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Gele ist im Folgenden zusammengetragen.

#### *Pufferzusammensetzung*

Gelpuffer: 1 M TRIS, 0.1 % SDS, pH 8.45.

Beladungspuffer (4-fach konzentriert): 250 mM Tris (pH 7.7), 30% (v/v) Glycerin, 12% (w/v) SDS, 10% (v/v) Mercaptoethanol, 0.05% (w/v) Coomassie-Blau.

Anodenpuffer: 200 mM Tris, pH 8.9.

Katodenpuffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0.1% SDS, pH 8.25.

#### *Gelzusammensetzung*

Trenngel (16%): 16% Acrylamid, 2% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, 1 M Tris (pH 8.45), 0.1% SDS, 0.03% Ammoniumpersulfat, 0.3% TEMED.

---

Spacergel (10%): 10% Acrylamid, 0.6% Bisacrylamid, 10% Glycerin, 1 M Tris (pH 8.45), 0.1% SDS, 0.03% Ammoniumpersulfat, 0.3% TEMED.

Sammelgel (4%): 4% Acrylamid, 0.25% Bisacrylamid, 1 M Tris (pH 8.45), 0.1% SDS, 0.03% Ammoniumpersulfat, 0.3% TEMED.

### **Markierung und Blotting des Extrazellulärteils des humanen Y2-Rezeptors**

Die experimentellen Details dieser Versuche sind von M. sc. Sarah Zernia (Universität Leipzig) in ihrer Masterarbeit<sup>[130]</sup> und von Seitz et al.<sup>[131]</sup> dokumentiert worden.

## 6.6 Versuche zur Proteinmarkierung *in vivo*

### TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-RRRRRRRRR-G-NH<sub>2</sub> (124)

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>GGRRRRRRRRRG wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (26.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 2 min, 1 mL) behandelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Als manueller Kupplungsschritt wurde das Harz mit 4.5 Äq. Mmt-MPA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 4 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM versetzt über 45 min und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Dann wurde das Harz mit DMF/2,6-Lutidin/Ac<sub>2</sub>O (89:6:5, 10 min) behandelt und wieder gewaschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurde das Harz mit 4 Äq. Mmt-Gly-OH (Endkonzentration 0.05 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min behandelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und der Mmt-Entschützung mittels CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIS (96:2:2, 2 x 1 min) wurden 4 Äq. TAMRA-OH (Endkonzentration 0.5 M in DMF), 3.6 Äq. HCTU und 8 Äq. NMM über 45 min gekuppelt. Nach dem Waschen (5x DMF, 10x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde das Produkt vom Harz abgespalten und nach dem unter 6.2 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Ausbeute: 440 nmol, 9%.

C<sub>189</sub>H<sub>324</sub>N<sub>66</sub>O<sub>44</sub>S (4257.06 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 1.54 min (03% B – 90% B in 4 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+4H+4TFA]<sup>4+</sup>: 1179.2 (ber.: 1179.3), [M+4H+3TFA]<sup>4+</sup>: 1150.8 (ber.: 1150.8), [M+4H+2TFA]<sup>4+</sup>: 1122.7 (ber.: 1122.3), [M+5H+4TFA]<sup>5+</sup>: 943.7 (ber.: 943.6), [M+5H+3TFA]<sup>5+</sup>: 920.9 (ber.: 920.8), [M+5H+2TFA]<sup>5+</sup>: 898.1 (ber.: 898.0), [M+6H+4TFA]<sup>6+</sup>: 786.7 (ber.: 786.5), [M+6H+3TFA]<sup>6+</sup>: 767.8 (ber.: 767.5), [M+6H+2TFA]<sup>6+</sup>: 748.8 (ber.: 748.5), [M+6H+TFA]<sup>6+</sup>: 729.9 (ber.: 729.5), [M+7H+3TFA]<sup>7+</sup>: 658.1 (ber.: 658.0), [M+7H+2TFA]<sup>7+</sup>: 641.8 (ber.: 641.7), [M+7H+TFA]<sup>7+</sup>: 625.5 (ber.: 625.4), [M+7H]<sup>7+</sup>: 609.3 (ber.: 609.2), [M+8H+2TFA]<sup>8+</sup>: 561.7 (ber.: 561.3), [M+8H+TFA]<sup>8+</sup>: 547.6 (ber.: 547.4), [M+8H]<sup>8+</sup>: 533.4 (ber.: 533.1), [M+9H+TFA]<sup>9+</sup>: 468.4 (ber.: 468.6), [M+9H]<sup>9+</sup>: 474.4 (ber.: 474.0), [M+10H]<sup>10+</sup>: 427.0 (ber.: 426.7).



**TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-RKKRRQRRR-G-NH<sub>2</sub> (125)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>GGRKKRRQRRRG wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (26.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Die Kupplungen von Mmt-MPA-OH, Mmt-Gly-OH und TAMRA-OH erfolgten analog zu Verbindung **124**. Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 540 nmol, 11%.

C<sub>194</sub>H<sub>332</sub>N<sub>64</sub>O<sub>46</sub>S (4329.16 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 1.50 min (03% B – 90% B in 4 min).

ESI-MS (*m/z*): [M+4H+3TFA]<sup>4+</sup>: 1168.8 (ber.: 1168.8), [M+4H+2TFA]<sup>4+</sup>: 1140.1 (ber.: 1140.3), [M+4H+TFA]<sup>4+</sup>: 1111.8 (ber.: 1111.8), [M+5H+2TFA]<sup>5+</sup>: 935.5 (ber.: 935.2), [M+5H+TFA]<sup>5+</sup>: 912.5 (ber.: 912.4), [M+5H]<sup>5+</sup>: 890.0 (ber.: 889.6), [M+6H+2TFA]<sup>6+</sup>: 760.6 (ber.: 760.5), [M+6H+TFA]<sup>6+</sup>: 741.8 (ber.: 741.5), [M+6H]<sup>6+</sup>: 722.6 (ber.: 722.5), [M+7H+2TFA]<sup>7+</sup>: 652.1 (ber.: 652.0), [M+7H+TFA]<sup>7+</sup>: 635.8 (ber.: 635.7), [M+7H]<sup>7+</sup>: 619.5 (ber.: 619.5), [M+8H+TFA]<sup>8+</sup>: 556.7 (ber.: 556.4), [M+8H]<sup>8+</sup>: 542.2 (ber.: 542.1), [M+9H]<sup>9+</sup>: 482.1 (ber.: 482.0).

**TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-KLALKLALKALKKAALKLA-G-NH<sub>2</sub> (126)**

Die Peptidsequenz (KIAALKE)<sub>3</sub>GGKLALKLALKALKKAALKLAG wurde nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese nach Fmoc-Strategie als 5 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (26.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Die Kupplungen von Mmt-MPA-OH, Mmt-Gly-OH und TAMRA-OH erfolgten analog zu Verbindung **124**. Das Produkt wurde nach den unter 6.2 beschriebenen Protokollen vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 310 nmol, 6%.

C<sub>231</sub>H<sub>395</sub>N<sub>57</sub>O<sub>54</sub>S (4867.01 Da).

HPLC: t<sub>R</sub> = 1.95 (03% B – 90% B in 4 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup>: 4870.2 Da (ber.: 4868.0 Da).

# 7

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AEE	2-(2-Aminoethoxy)ethanol
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure(n)
a.u.	<i>arbitrary units</i> (dt. willkürliche Einheiten)
ber.	Berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (dt. Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i> , Zellkulturmedium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
EDC	<i>N</i> -(Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid Hydrochlorid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (dt. und andere)
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FLD	Fluoreszenzdetektion
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
gef.	gefunden
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (dt. G-Protein gekoppelter Rezeptor)

---

h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin-Epitop
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i> , Zellkulturmedium
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat
HCTU	2-(6-Chloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
2 <i>i</i> PrPh	2-Isopropylphenylmethyl
kDa	Kilodalton
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{em}$	Anregungswellenlänge
LDT	ligandendirierte Tosylchemie
Lsg.	Lösung
MA	Mercaptoessigsäure
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>
min	Minute
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MPA	Mercaptopropionsäure
MPAA	Mercaptophenyllessigsäure
MS	Massenspektrometrie
NCL	native chemische Ligation
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (dt. Kernspinresonanz)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (dt. phosphatgepufferte Salzlösung)
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
POI	<i>protein of interest</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluensulfonat

PTS	Protein- <i>trans</i> -Spleißen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
$R_f$	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (dt. Natriumlaurylsulfat)
slit	Schlitzbreite des Fluoreszenzmikroskops
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (dt. Festphasenpeptidsynthese)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TMR	Carboxytetramethylrhodamin
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>time of flight</i>
$t_R$	Retentionszeit
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,2-diol
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche

# 8 Literaturverzeichnis

- [1] a) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, *Science* **1994**, 263, 802-805; b) R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **1995**, 373, 663-664.
- [2] a) D. Shcherbo, I. I. Shemiakina, A. V. Ryabova, K. E. Luker, B. T. Schmidt, E. A. Souslova, T. V. Gorodnicheva, L. Strukova, K. M. Shidlovskiy, O. V. Britanova, A. G. Zaisky, K. A. Lukyanov, V. B. Loschenov, G. D. Luker, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2010**, 7, 827-829; b) A. M. Bogdanov, A. Acharya, A. V. Titelmayer, A. V. Mamontova, K. B. Bravaya, A. B. Kolomeisky, K. A. Lukyanov, A. I. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 4807-4817.
- [3] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 86-89.
- [4] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 128-136.
- [5] L. W. Miller, Y. F. Cai, M. P. Sheetz, V. W. Cornish, *Nat. Methods* **2005**, 2, 255-257.
- [6] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohane, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373-382.
- [7] a) E. A. Rodriguez, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 8650-8655; b) H. Neumann, *FEBS Lett.* **2012**, 586, 2057-2064.
- [8] a) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 341-343; b) T. Hayashi, I. Hamachi, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1460-1469.
- [9] D. Beckett, E. Kovaleva, P. J. Schatz, *Protein Sci.* **1999**, 8, 921-929.
- [10] a) M. Howarth, K. Takao, Y. Hayashi, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 7583-7588; b) M. Howarth, W. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2008**, 5, 397-399.
- [11] M. Fernández-Suárez, T. S. Chen, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9251-9253.
- [12] E. Steel, V. L. Murray, A. P. Liu, *PLoS ONE* **2014**, 9, e93646.
- [13] A. Miyawaki, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 885-886.

- 
- [14] M. Desbois, S. J. Cook, S. W. Emmons, H. E. Bülow, *Genetics* **2015**, *200*, 697-705.
- [15] a) I. Chen, M. Howarth, W. Y. Lin, A. Y. Ting, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 99-104; b) S. A. Slavoff, I. Chen, Y.-A. Choi, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1160-1162.
- [16] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1483-1487.
- [17] S. Puthenveetil, D. S. Liu, K. A. White, S. Thompson, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16430-16438.
- [18] a) C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernandez-Suarez, S. Puthenveetil, A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10914-10919; b) J. D. Cohen, S. Thompson, A. Y. Ting, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8221-8225.
- [19] J. D. Cohen, P. Zou, A. Y. Ting, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 888-894.
- [20] a) D. S. Liu, A. Tangpeerachaikul, R. Selvaraj, M. T. Taylor, J. M. Fox, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 792-795; b) M. Best, A. Degen, M. Baalman, T. T. Schmidt, R. Wombacher, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1158-1162.
- [21] S. Hauke, M. Best, T. T. Schmidt, M. Baalman, A. Krause, R. Wombacher, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1632-1637.
- [22] D. Schumacher, J. Helma, F. A. Mann, G. Pichler, F. Natale, E. Krause, M. C. Cardoso, C. P. R. Hackenberger, H. Leonhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13787-13791.
- [23] J. Yin, F. Liu, X. Li, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7754-7755.
- [24] a) J. Yin, F. Liu, M. Schinke, C. Daly, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13570-13571; b) J. Yin, A. J. Lin, P. D. Buckett, M. Wessling-Resnick, D. E. Golan, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 999-1006.
- [25] B. H. Meyer, J. M. Segura, K. L. Martinez, R. Hovius, N. George, K. Johnsson, H. Vogel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2138-2143.
- [26] a) J. Yin, P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golan, N. L. Kelleher, R. Kolter, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 15815-15820; b) Z. Zhou, P. Cironi, A. J. Lin, Y. Xu, S. Hrvatin, D. E. Golan, P. A. Silver, C. T. Walsh, J. Yin, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 337-346.
- [27] L. Marchetti, T. De Nadai, F. Bonsignore, M. Calvello, G. Signore, A. Viegi, F. Beltram, S. Luin, A. Cattaneo, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113708.
- [28] A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 13-28.
- [29] J. Tominaga, N. Kamiya, S. Doi, H. Ichinose, T. Maruyama, M. Goto, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2299-2304.
- [30] C.-W. Lin, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4542-4543.
- [31] K. Heller, P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen, C. Hedberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10327-10330.
- [32] H. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2670-2671.

- 
- [33] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 707-708.
- [34] M. W. Popp, S. K. Dougan, T.-Y. Chuang, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 3169-3174.
- [35] J. M. Antos, G. M. Miller, G. M. Grotenbreg, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16338-16343.
- [36] X. Guo, Q. Wang, B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9878-9879.
- [37] Z. Wu, X. Guo, Z. Guo, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9218-9220.
- [38] D. J. Williamson, M. A. Fascione, M. E. Webb, W. B. Turnbull, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9377-9380.
- [39] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321-322.
- [40] E. L. Smith, J. P. Giddens, A. T. Iavarone, K. Godula, L.-X. Wang, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 788-795.
- [41] P. G. Holder, L. C. Jones, P. M. Drake, R. M. Barfield, S. Bañas, G. W. de Hart, J. Baker, D. Rabuka, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 15730-15745.
- [42] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269-272.
- [43] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063-6076.
- [44] H. Cao, B. Chen, T. C. Squier, M. U. Mayer, *Chem. Commun.* **2006**, 2601-2603.
- [45] H. Cao, Y. Xiong, T. Wang, B. Chen, T. C. Squier, M. U. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8672-8673.
- [46] C. Hoffmann, G. Gaietta, A. Zurn, S. R. Adams, S. Terrillon, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, M. J. Lohse, *Nat. Protocols* **2010**, *5*, 1666-1677.
- [47] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438-439.
- [48] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Nat. Biotech.* **1988**, *6*, 1321-1325.
- [49] a) A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, R. Tampé, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5249-5259; b) S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205-10215.
- [50] R. Wieneke, A. Raulf, A. Kollmannsperger, M. Heilemann, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *127*, 10175-10175.
- [51] G. D. Meredith, H. Y. Wu, N. L. Allbritton, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 969-982.
- [52] M. Hintersteiner, T. Weidemann, T. Kimmerlin, N. Filiz, C. Buehler, M. Auer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1391-1395.
- [53] C. B. Rosen, L. B. KodalAnne, J. S. Nielsen, D. H. Schaffert, C. Scavenius, A. H. Okholm, N. V. Voigt, J. J. Enghild, J. Kjems, T. Tørring, K. V. Gothelf, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 804-809.

- [54] C. T. Hauser, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 3693-3697.
- [55] S.-H. Fujishima, H. Nonaka, S.-H. Uchinomiya, Y. A. Kawase, A. Ojida, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 594-596.
- [56] A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10452-10459.
- [57] H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15777-15779.
- [58] a) H. Nonaka, S.-H. Fujishima, S.-H. Uchinomiya, A. Ojida, I. Hamachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6696-6699; b) A. Ojida, S.-H. Fujishima, K. Honda, H. Nonaka, S.-H. Uchinomiya, I. Hamachi, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 877-886.
- [59] S. Sueda, S. Tanaka, S. Inoue, H. Komatsu, *Anal. Biochem.* **2012**, *422*, 52-54.
- [60] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, E. Terreno, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 19-29.
- [61] K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 265-271.
- [62] M. Nitz, K. J. Franz, R. L. Maglathlin, B. Imperiali, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 272-276.
- [63] L. J. Martin, B. R. Sculimbrene, M. Nitz, B. Imperiali, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 1149-1157.
- [64] M. N. Rozinov, G. P. Nolan, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 713-728.
- [65] M. Sunbul, L. Nacheva, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1466-1469.
- [66] C. F. Barbas, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 7978-7982.
- [67] G. M. Eldridge, G. A. Weiss, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2143-2153.
- [68] T. Kawakami, K. Ogawa, N. Goshima, T. Natsume, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1671-1679.
- [69] Y. Chen, C. M. Clouthier, K. Tsao, M. Strmiskova, H. Lachance, J. W. Keillor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13785-13788.
- [70] B. Tripet, L. Yu, D. L. Bautista, W. Y. Wong, R. T. Irvin, R. S. Hodges, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 1029-1042.
- [71] J. R. Litowski, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37272-37279.
- [72] Y. Yano, A. Yano, S. Oishi, Y. Sugimoto, G. Tsujimoto, N. Fujii, K. Matsuzaki, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 341-345.
- [73] a) K. Kawano, Y. Yano, K. Omae, S. Matsuzaki, K. Matsuzaki, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3454-3461; b) H. Yamashita, Y. Yano, K. Kawano, K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes* **2015**, *1848*, 1359-1366.
- [74] B. V. Popp, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6660-6662.
- [75] Z. Chen, B. V. Popp, C. L. Bovet, Z. T. Ball, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 920-925.
- [76] J. P. Wang, Y. S. Yu, J. Xia, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 178-187.
- [77] Y. Yano, N. Furukawa, S. Ono, Y. Takeda, K. Matsuzaki, *J. Pept. Sci.* **2016**, *106*, 484-490.



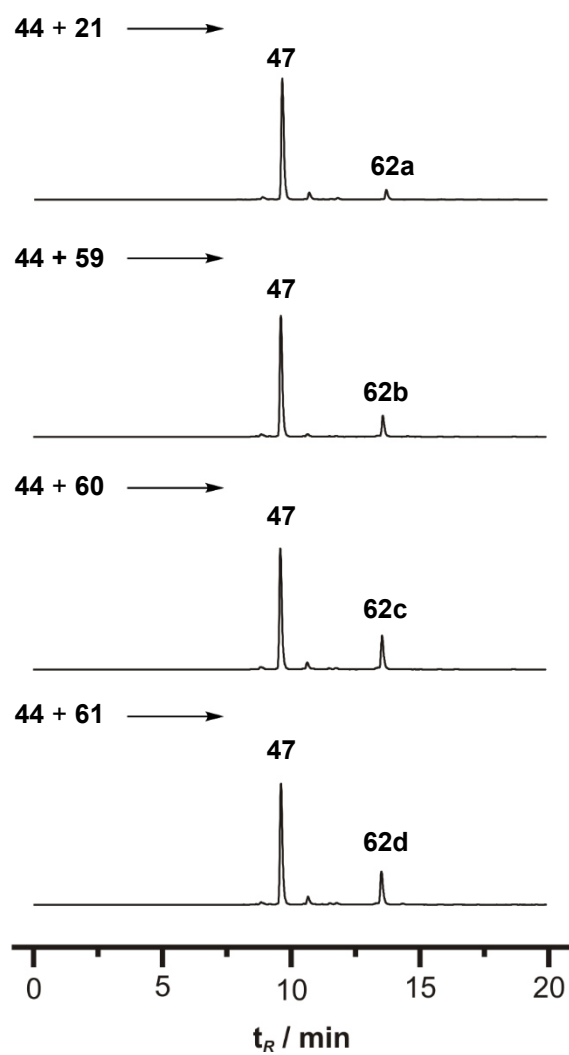
- 
- [78] H. Tsutsumi, W. Nomura, S. Abe, T. Mino, A. Masuda, N. Ohashi, T. Tanaka, K. Ohba, N. Yamamoto, K. Akiyoshi, H. Tamamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9164-9166.
- [79] W. Nomura, T. Mino, T. Narumi, N. Ohashi, A. Masuda, C. Hashimoto, H. Tsutsumi, H. Tamamura, *J. Pept. Sci.* **2010**, *94*, 843-852.
- [80] W. Nomura, N. Ohashi, A. Mori, H. Tamamura, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1080-1085.
- [81] M. Harel, R. Kasher, A. Nicolas, J. M. Guss, M. Balass, M. Fridkin, A. B. Smit, K. Brejc, T. K. Sixma, E. Katchalski-Katzir, J. L. Sussman, S. Fuchs, *Neuron* **2001**, *32*, 265-275.
- [82] C. M. McCann, F. M. Bareyre, J. W. Lichtman, J. R. Sanes, *Biotechniques* **2005**, *38*, 945-952.
- [83] Y. Sekine-Aizawa, R. L. Haganir, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17114-17119.
- [84] H. D. Mootz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2579-2589.
- [85] J. Zettler, V. Schütz, H. D. Mootz, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 909-914.
- [86] R. Borra, D. Z. Dong, A. Y. Elnagar, G. A. Woldemariam, J. A. Camarero, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6344-6353.
- [87] D. Jung, K. Sato, K. Min, A. Shigenaga, J. Jung, A. Otaka, Y. Kwon, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9670-9673.
- [88] N. H. Shah, G. P. Dann, M. Vila-Perelló, Z. Liu, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11338-11341.
- [89] Y. David, M. Vila-Perelló, S. Verma, T. W. Muir, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 394-402.
- [90] I. V. Thiel, G. Volkmann, S. Pietrokovski, H. D. Mootz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1306-1310.
- [91] M. Braner, A. Kollmannsperger, R. Wieneke, R. Tampé, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2646-2652.
- [92] a) D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, *382*, 525-528; b) K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, *389*, 706-709.
- [93] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [94] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559-10560.
- [95] a) S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 489-492; b) S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 478-481.
- [96] B. Rubinov, N. Wagner, H. Rapaport, G. Ashkenasy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6683-6686.
- [97] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49-56.
- [98] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596-15597.
- [99] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723-6730.

- 
- [100] T. N. Grossmann, L. Roeglin, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7119-7122.
- [101] A. Roloff, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 432-436.
- [102] A. Roloff, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 3458-3464.
- [103] a) A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2828-2832; b) A. Erben, O. Seitz, *Isr. J. Chem.* **2011**, 51, 876-884.
- [104] O. Vazquez, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 2850-2854.
- [105] D. A. Lindhout, J. R. Litowski, P. Mercier, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Biopolymers* **2004**, 75, 367-375.
- [106] S. Tsukiji, H. X. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9046-9054.
- [107] J. Michaelis, G. J. van der Heden van Noort, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 18-23.
- [108] L. M. M. Jenkins, D. E. Ott, R. Hayashi, L. V. Coren, D. Wang, Q. Xu, M. L. Schito, J. K. Inman, D. H. Appella, E. Appella, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 887-889.
- [109] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, in *Stryer Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin, Deutschland, **2014**, Kapitel 30: *Proteinsynthese*, S. 314.
- [110] I. L. Reich, A. F. Diaz, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 5635-5637.
- [111] N. Menshutkin, *Z. Physik. Chem.* **1900**, 34, 157-167.
- [112] S.-D. Yoh, D.-Y. Cheong, *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, 9, 701-705.
- [113] S. Mourtas, D. Gatos, V. Kalaitzi, C. Katakoulou, K. Barlos, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6965-6967.
- [114] M. Canle L, W. Clegg, I. Demirtas, M. R. J. Elsegood, H. Maskill, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 85-92.
- [115] C. Haase, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 13, 2096-2101.
- [116] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640-6646.
- [117] a) A. Gautam, J. S. Nanda, J. S. Samuel, M. Kumari, P. Priyanka, G. Bedi, S. K. Nath, G. Mittal, N. Khatri, G. P. S. Raghava, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 26278; b) R. Rezgui, K. Blumer, G. Yeoh-Tan, A. J. Trexler, M. Magzoub, *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes* **2016**, 1858, 1499-1506; c) C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Lett.* **2013**, 587, 1693-1702.
- [118] K. Mutai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, 44, 2537-2541.
- [119] a) S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957-989; b) G. B. Fields, J. L. Lauer-Fields, R.-Q. Liu, G. Barany, in *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman, New York, USA, **2001**, Kapitel: *Principles and practice of solid-phase peptide synthesis*, 93-219.
- [120] a) C. Walther, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Sci.* **2011**, 17, 233-246; b) R. E. Mercer, M. J. S. Chee, W. F. Colmers, *Front. Neuroendocrinol.* **2011**, 32, 398-415.

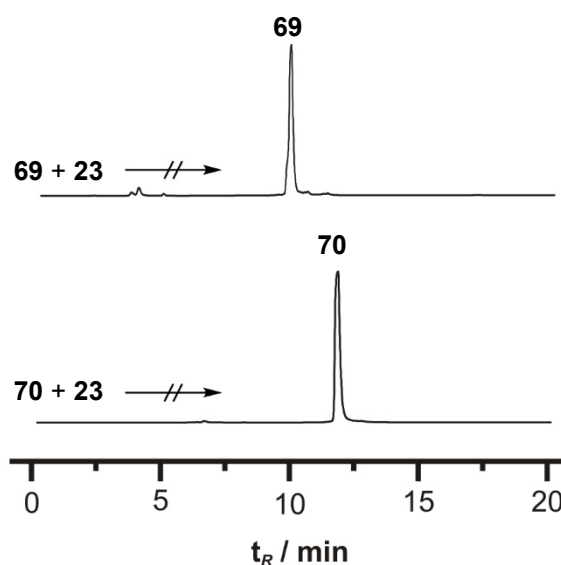
- 
- [121] A. Sharei, J. Zoldan, A. Adamo, W. Y. Sim, N. Cho, E. Jackson, S. Mao, S. Schneider, M.-J. Han, A. Lytton-Jean, P. A. Basto, S. Jhunjhunwala, J. Lee, D. A. Heller, J. W. Kang, G. C. Hartoularos, K.-S. Kim, D. G. Anderson, R. Langer, K. F. Jensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 2082-2087.
- [122] a) S. B. Fonseca, M. P. Pereira, S. O. Kelley, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 953-964; b) M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 509-514.
- [123] a) K. Melikov, A. Hara, K. Yamoah, E. Zaitseva, E. Zaitsev, Leonid V. Chernomordik, *Biochem. J.* **2015**, *471*, 221-230; b) G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R. M. Martin, M. Stöckl, A. Herrmann, M. C. Cardoso, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469-476.
- [124] U. Reinhardt, J. Lotze, K. Mörl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2106-2117.
- [125] Y.-D. Liao, J.-C. Jeng, C.-F. Wang, S.-C. Wang, S.-T. Chang, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1802-1810.
- [126] N. Nischan, H. D. Herce, F. Natale, N. Bohlke, N. Budisa, M. C. Cardoso, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1950-1953.
- [127] D. Böhme, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 186-200.
- [128] B. J. H. Kuipers, H. Gruppen, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5445-5451.
- [129] H. Schagger, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 16-22.
- [130] S. Zernia, *Masterarbeit*.
- [131] U. Reinhardt, J. Lotze, S. Zernia, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10237-10241.
- [132] I. Bohme, J. Stichel, C. Walther, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger, *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1740-1749.
- [133] a) S. Hofmann, R. Frank, E. Hey-Hawkins, A. G. Beck-Sickinger, P. Schmidt, *Neuropeptides* **2013**, *47*, 59-66; b) M. Findeisen, D. Rathmann, A. G. Beck-Sickinger, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1081-1093.

# 9 Anhang

## 9.1 Chromatogramme zu Versuchen aus Kapitel 4.2.2



**Abbildung 9.1:** FLD-HPLC-Analyse der Acyltransferreaktion zwischen dem Thioester-K3-Peptid **44** und den internen Cysteinyl-E3-Peptiden **21** bzw. **59** - **61** nach 60 min Reaktionszeit. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM TCEP, pH 7, RT;  $\lambda_{\text{Ex}} = 555 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 584 \text{ nm}$ .



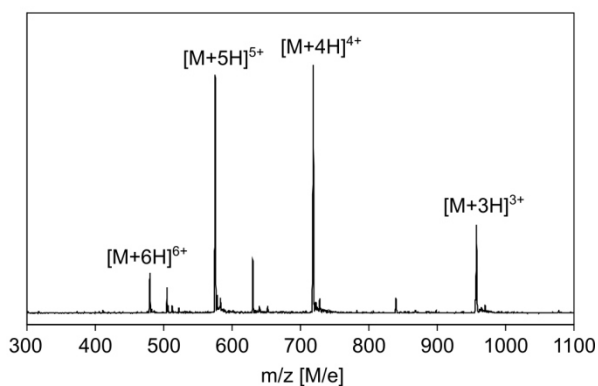
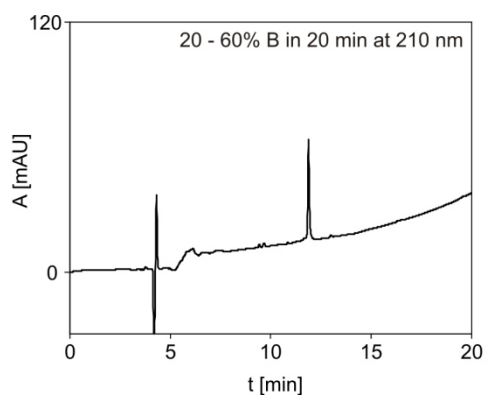
**Abbildung 9.2:** FLD-HPLC-Analyse der Reaktion zwischen den Thioester-K3-Peptide **69** (AF350) und **70** (ATTO488) und dem Kontroll-Cysteinylpeptid **23** (H-CRAEYISK) nach 10 min Reaktionszeit. Bedingungen: 500 nM Peptide, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TCEP, pH 7, RT; AF350:  $\lambda_{\text{Ex}} = 346$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 442$  nm; ATTO488:  $\lambda_{\text{Ex}} = 501$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 523$  nm

**Tabelle 9.1:** Zusammensetzung von DMEM in [mg/L].

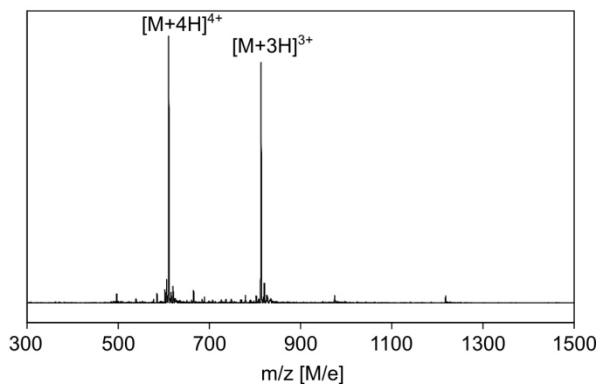
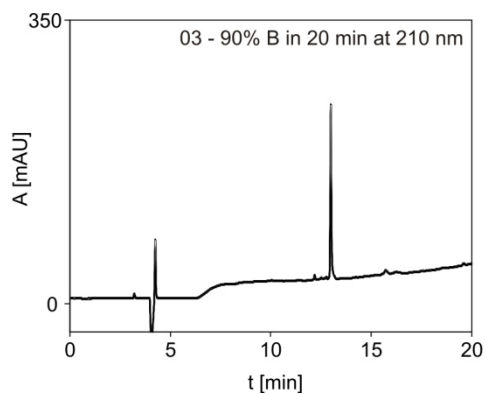
NaCl	6400	L-Glutamin	580	Glycin	30
KCl	400	L-Histidin	42	L-Serin	42
CaCl <sub>2</sub>	200	L-Isoleucin	106	Cholin.HCl	4
MgSO <sub>4</sub>	200	L-Leucin	106	Folsäure	4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	124	L-Lysin	146	$\mu$ -Inositol	7,2
D-Glukose	1000	L-Methionin	30	Nicotinamid	4
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,1	L-Phenylalanin	66	D-Ca-Pantothenat	4
Na-Pyruvat	110	L-Threonin	95	Pyridoxal	4
NaHCO <sub>3</sub>	3700	L-Tryptophan	16	Riboflavin	0,4
L-Arginin	84	L-Tyrosin	72	Thiamin	4
L-Cystin	48	L-Valin	94		

## 9.2 Chromatogramme und Massenspektren von Peptiden

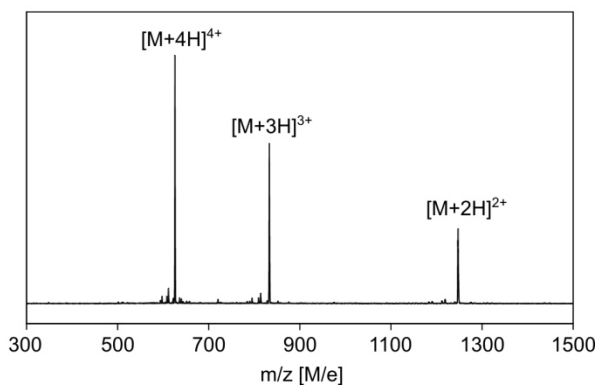
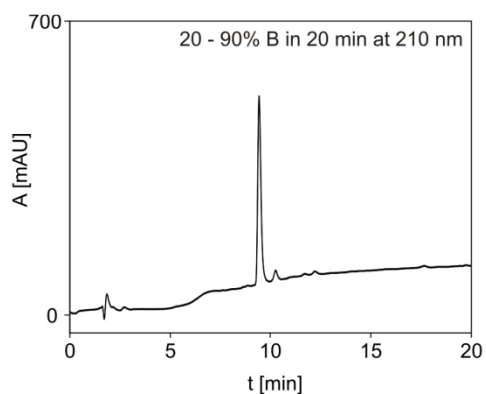
### C343-AEE-Sulfonat-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (5)

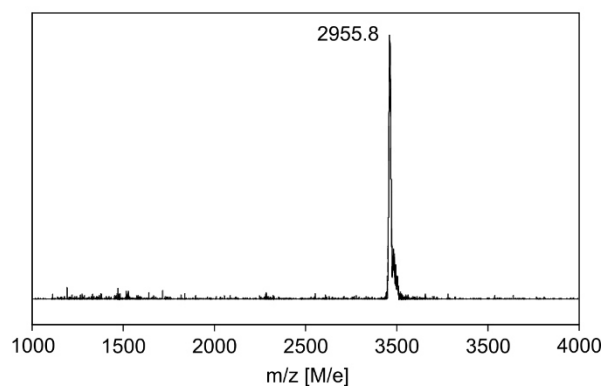
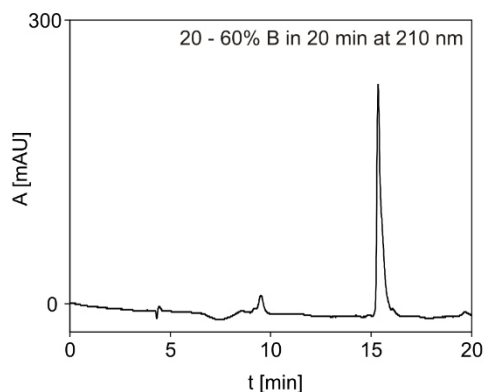
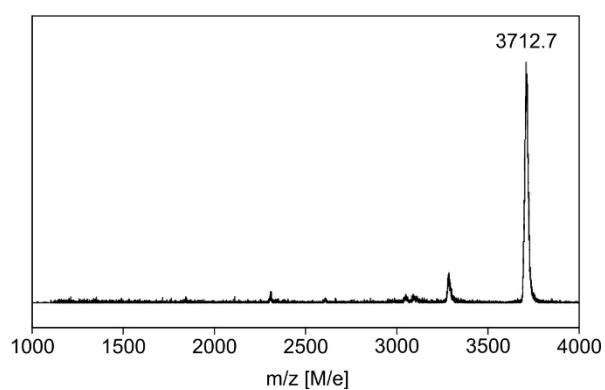
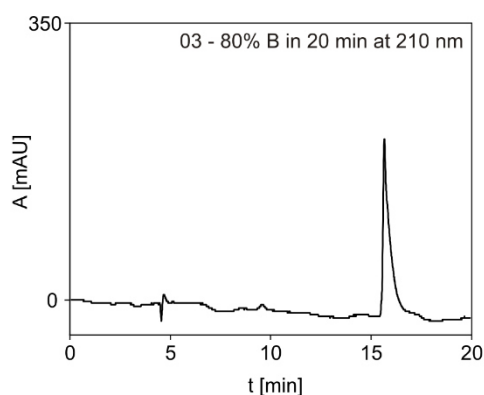
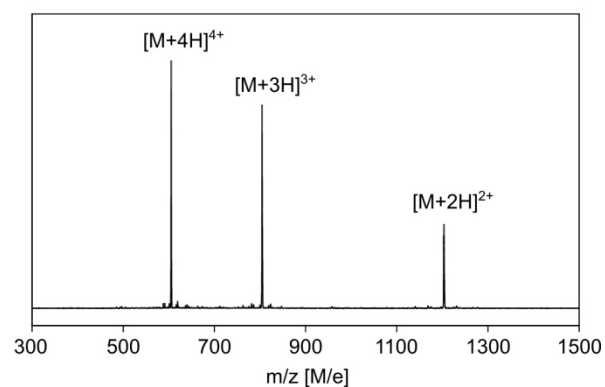
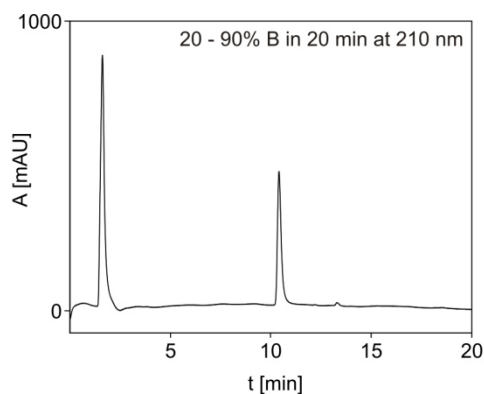
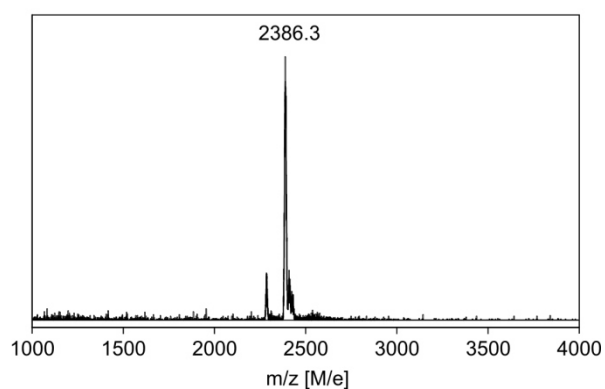
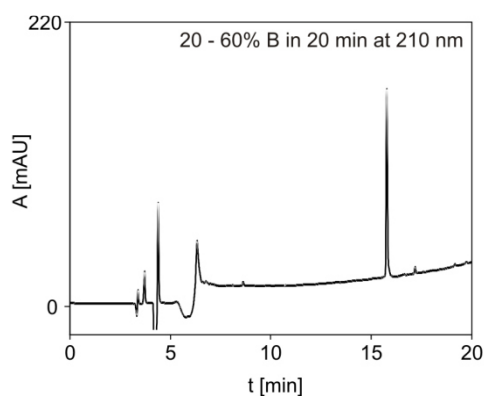


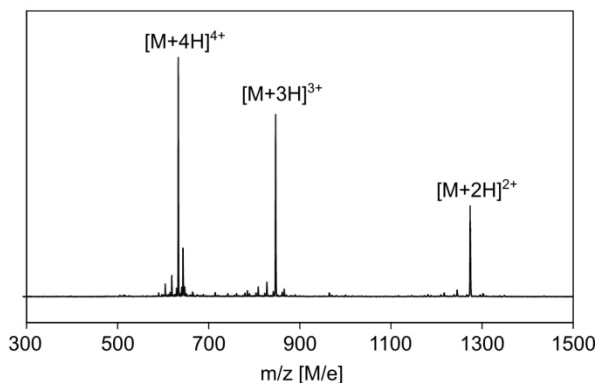
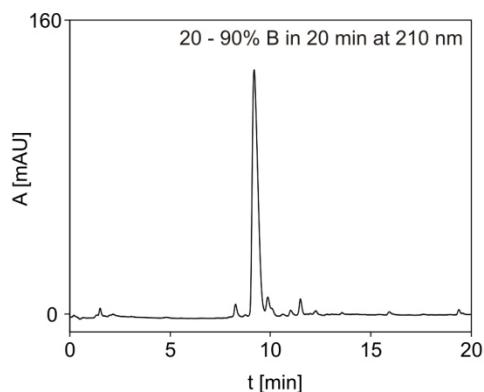
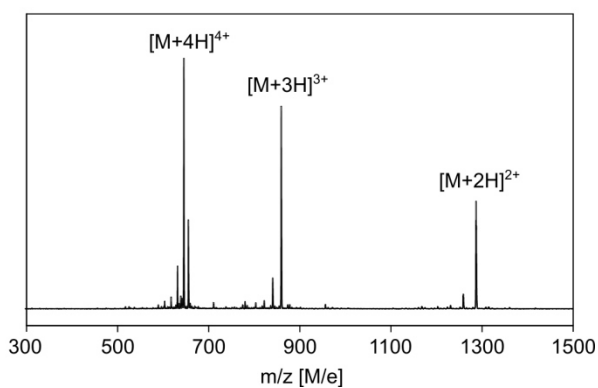
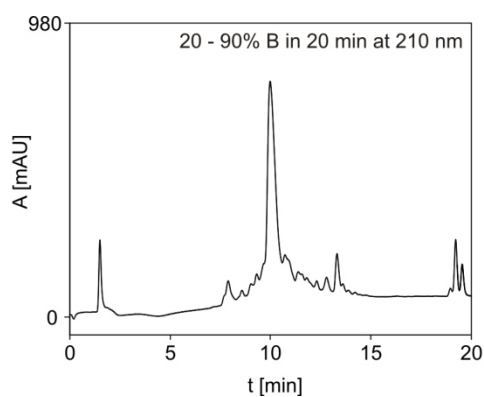
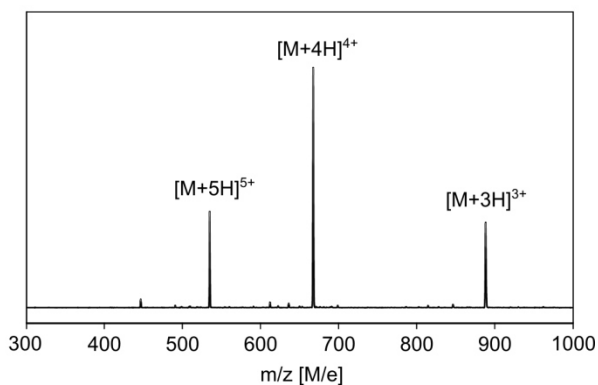
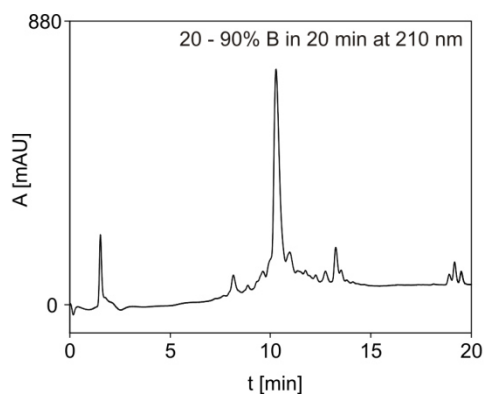
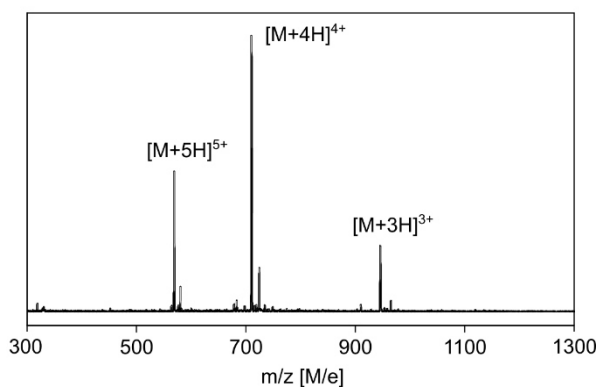
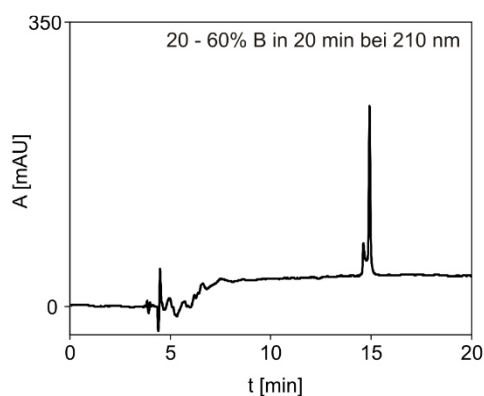
### H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (20)



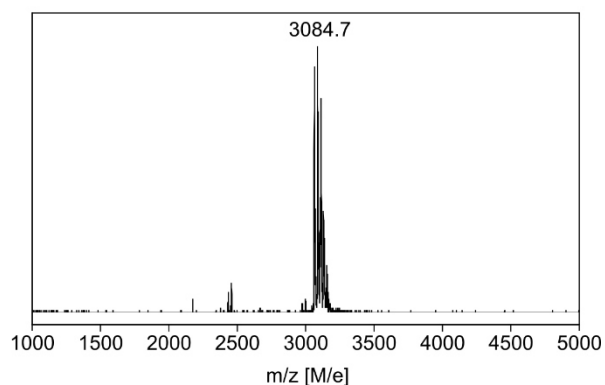
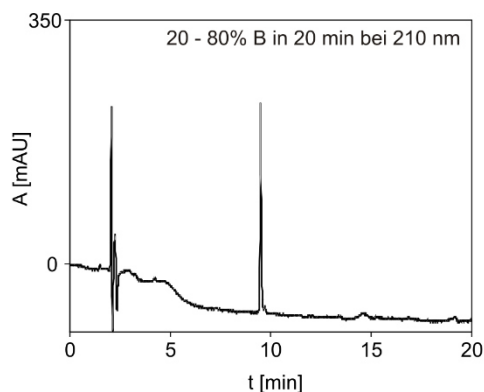
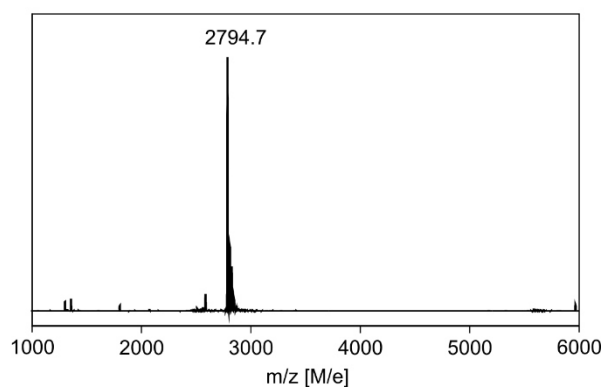
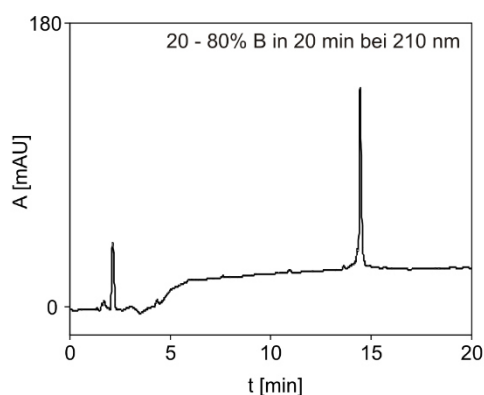
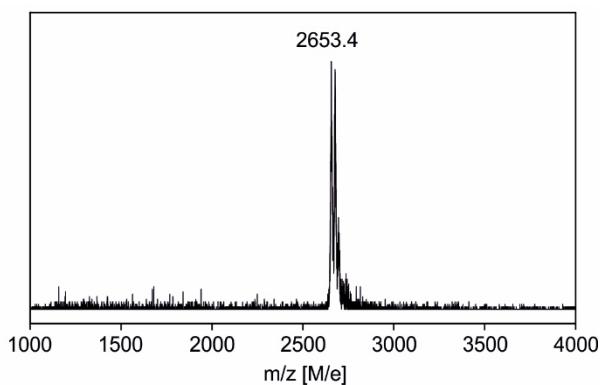
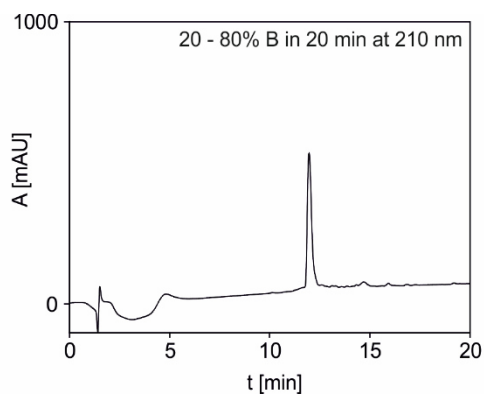
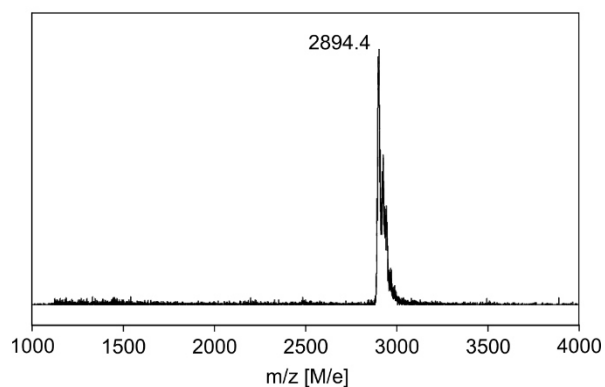
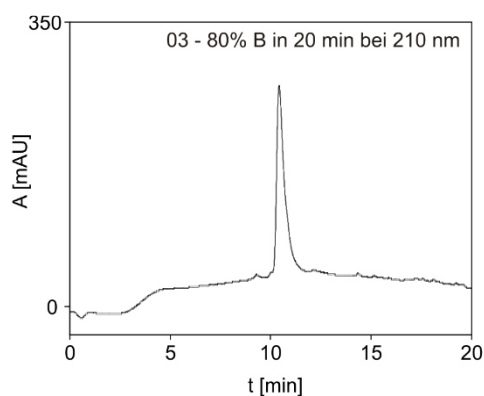
### H-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (21)

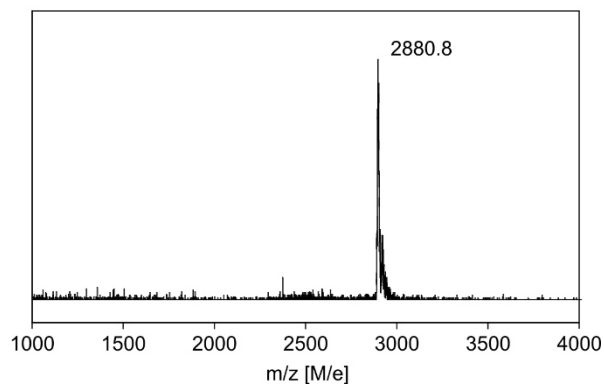
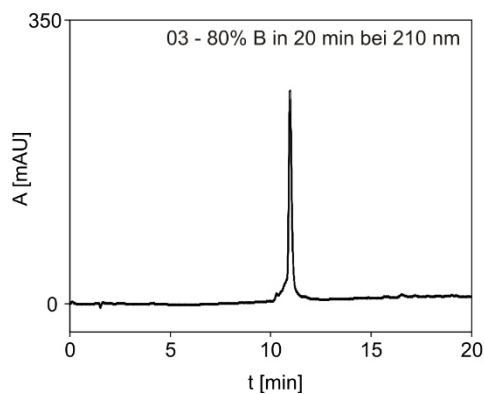
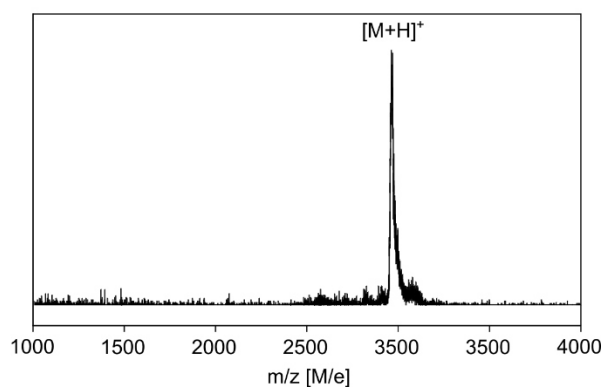
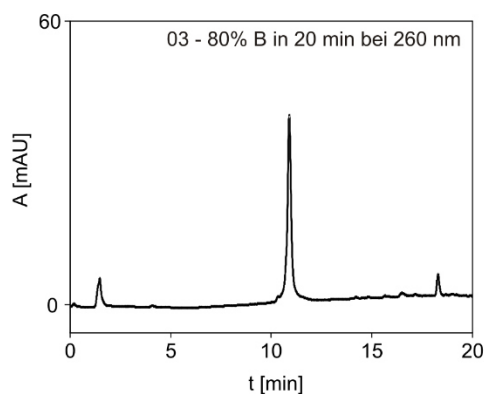
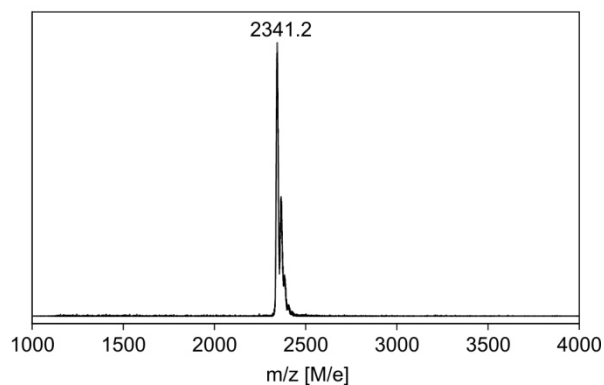
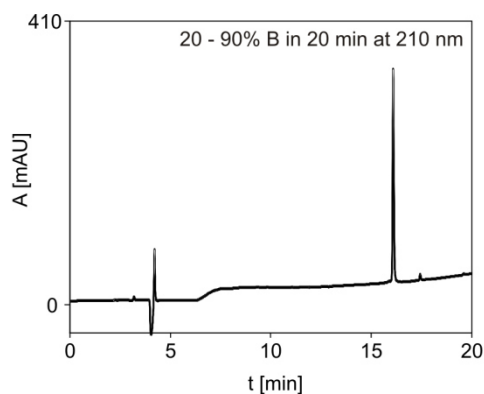
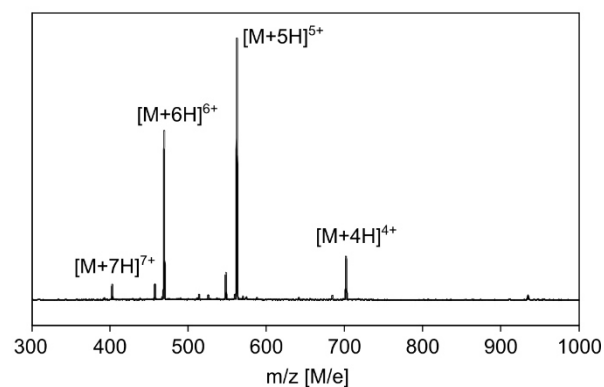
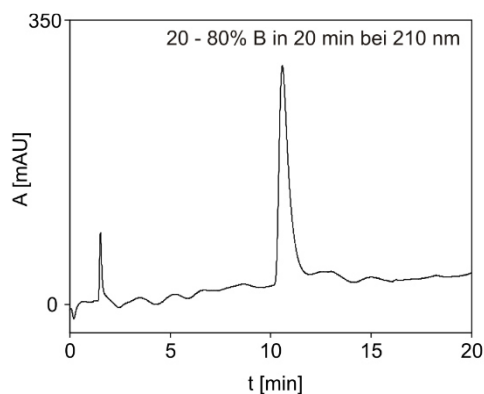


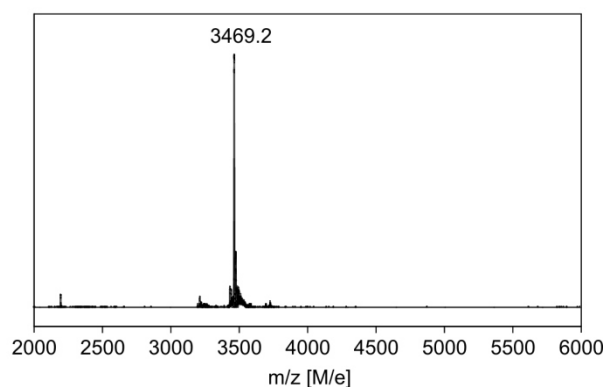
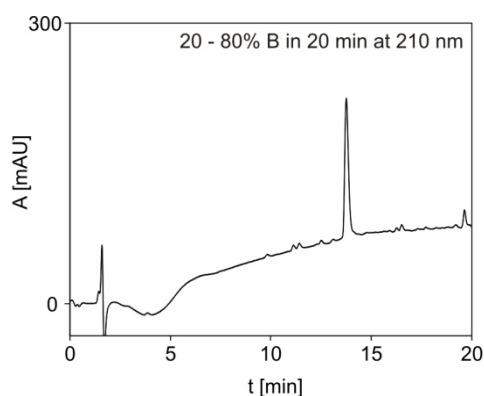
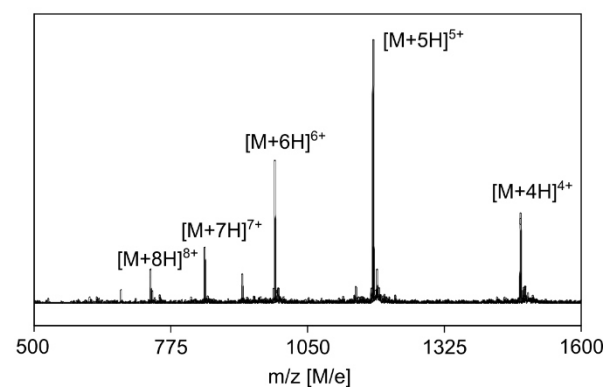
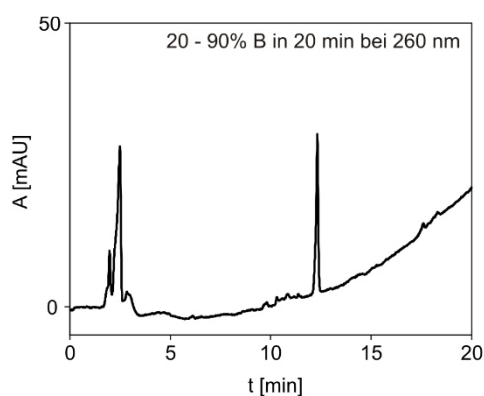
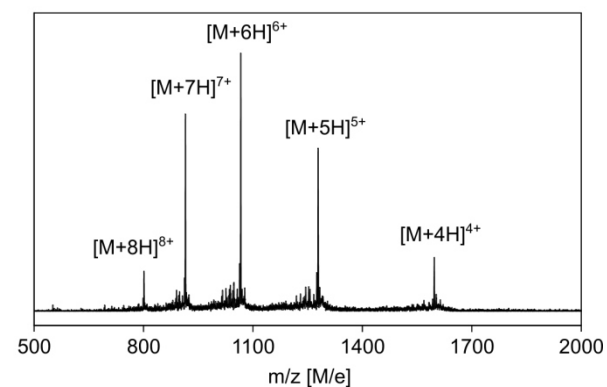
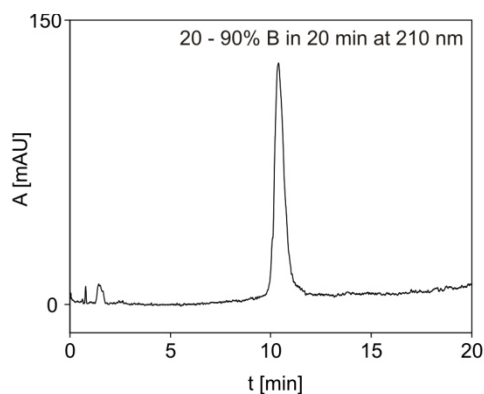
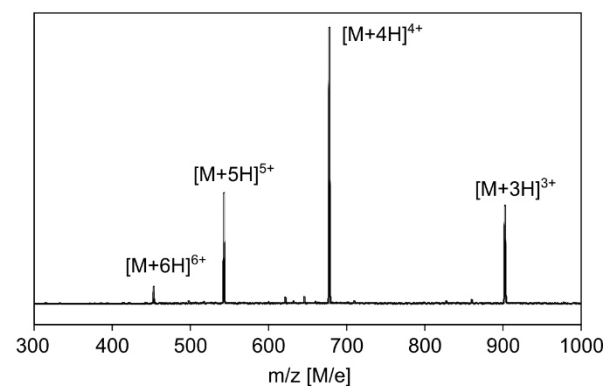
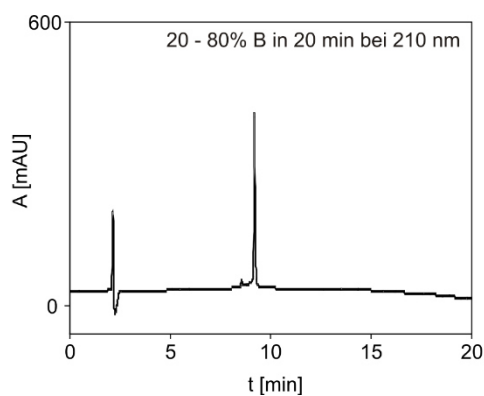
**TAMRA-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (44)****TAMRA-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>4</sub>G-NH<sub>2</sub> (45)****H-A(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (50)****H-(EIAALEK)<sub>3</sub>K(Cys)-NH<sub>2</sub> (52)**

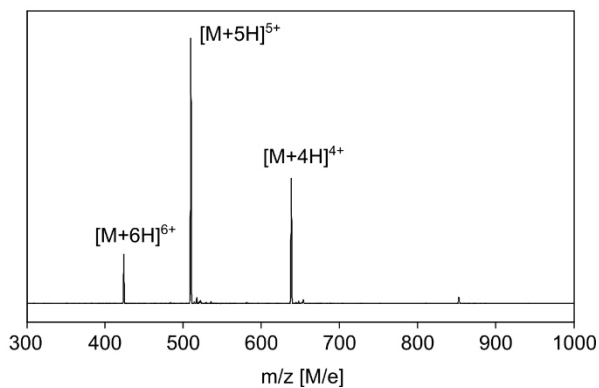
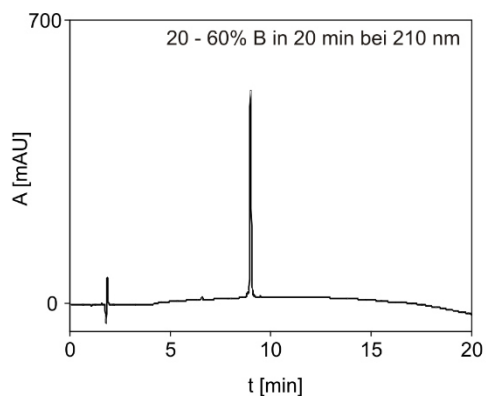
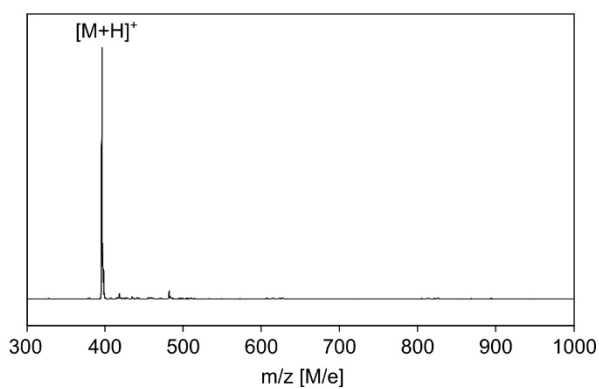
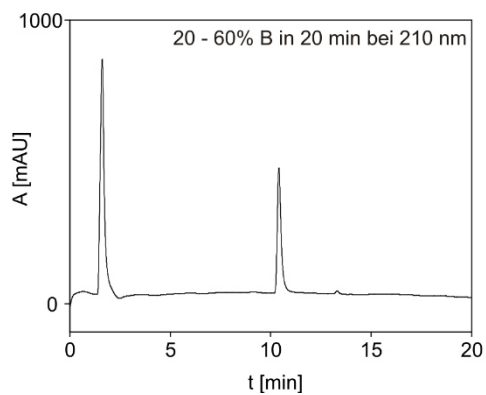
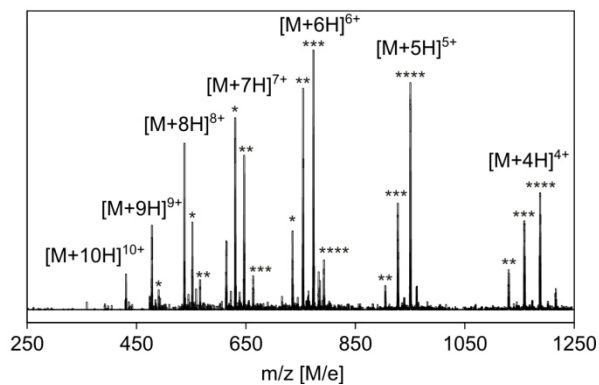
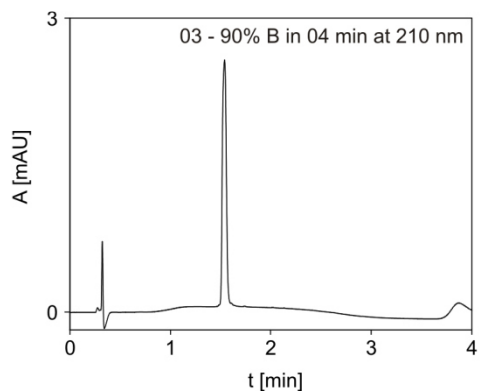
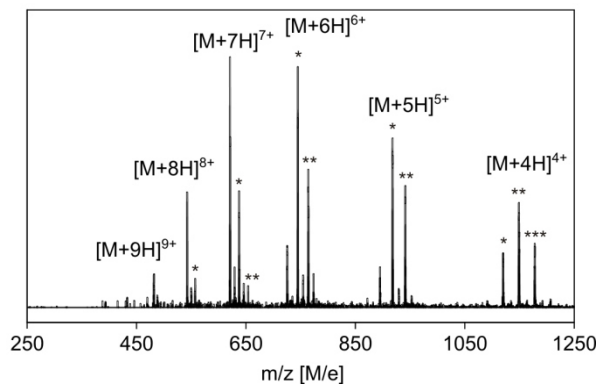
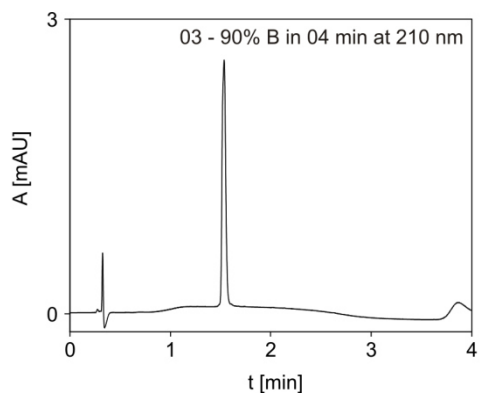
**H-G<sub>2</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (59)****H-G<sub>3</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (60)****H-G<sub>4</sub>C(EIAALEK)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (61)****AF350-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (69)**

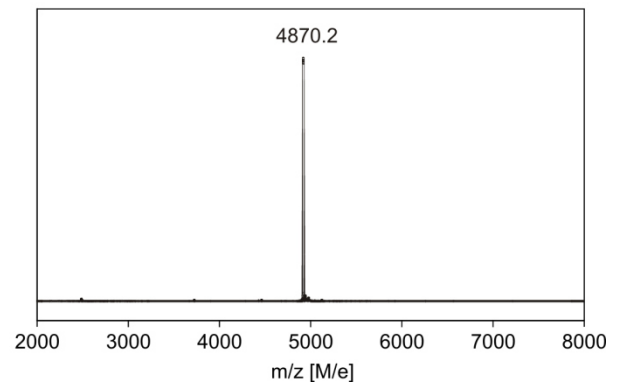
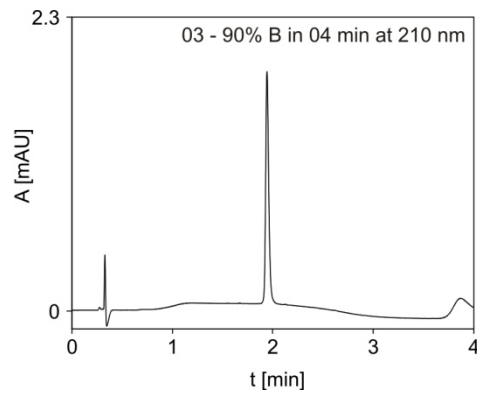


**ATTO488-G-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (70)****AF350-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (71)****H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>K(C343)-NH<sub>2</sub> (75)****TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (82)**

**TAMRA-G-MAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (83)****TAMRA-G-AcCys-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (84)****H-(EIAALEK)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (85)****TAMRA-G-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (92)**

**TAMRA-G-(KIAALKE)<sub>3</sub>(F<sup>NO2</sup>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (95)****H-C(EIAALEK)<sub>3</sub>-GG-WW2-NH<sub>2</sub> (96)****TAMRA-GC(EIAALEK)<sub>3</sub>-GG-WW2-NH<sub>2</sub> (97)****Biotin-MPAA-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (102)**

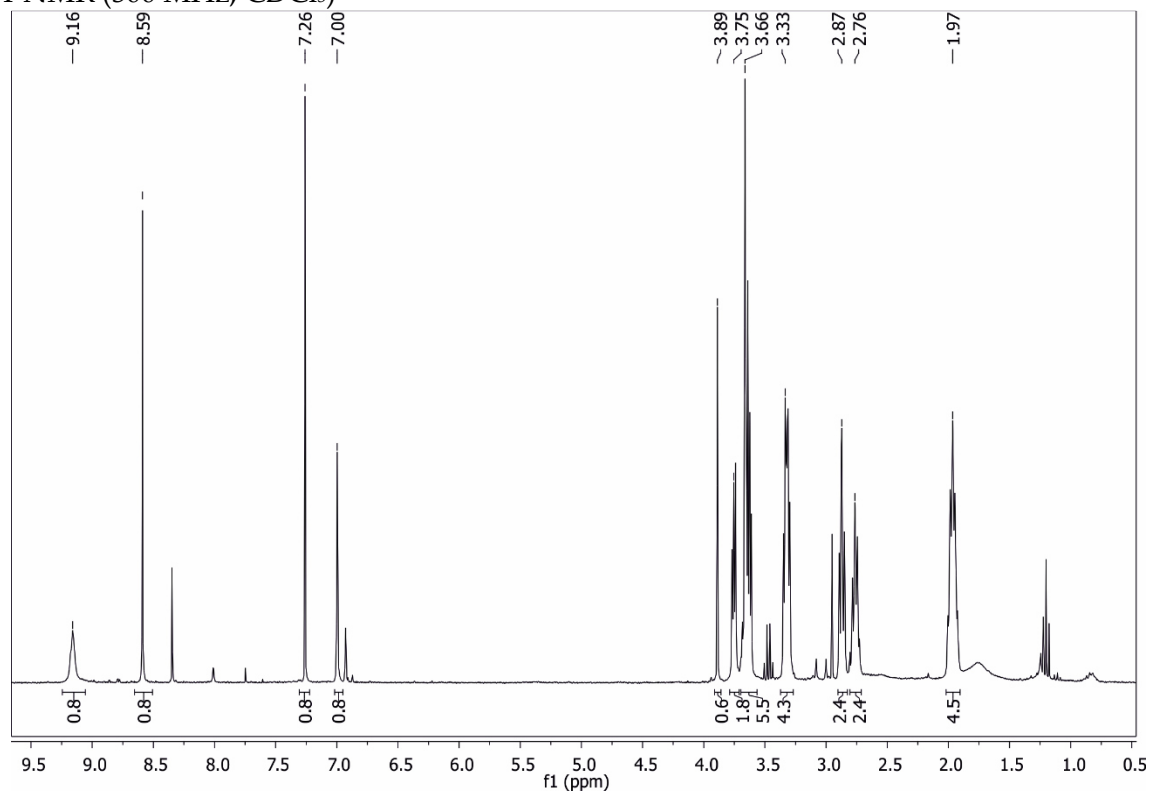
**Biotin-(KIAALKE)<sub>3</sub>G-NH<sub>2</sub> (104)****Biotin-MPAA-NH<sub>2</sub> (106)****TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-RRRRRRRRR-G-NH<sub>2</sub> (124)****TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-RKKRRQRRR-G-NH<sub>2</sub> (125)**

**TAMRA-G-MPA-(KIAALKE)<sub>3</sub>GG-KLALKLALKALKALKLA-G-NH<sub>2</sub> (126)**

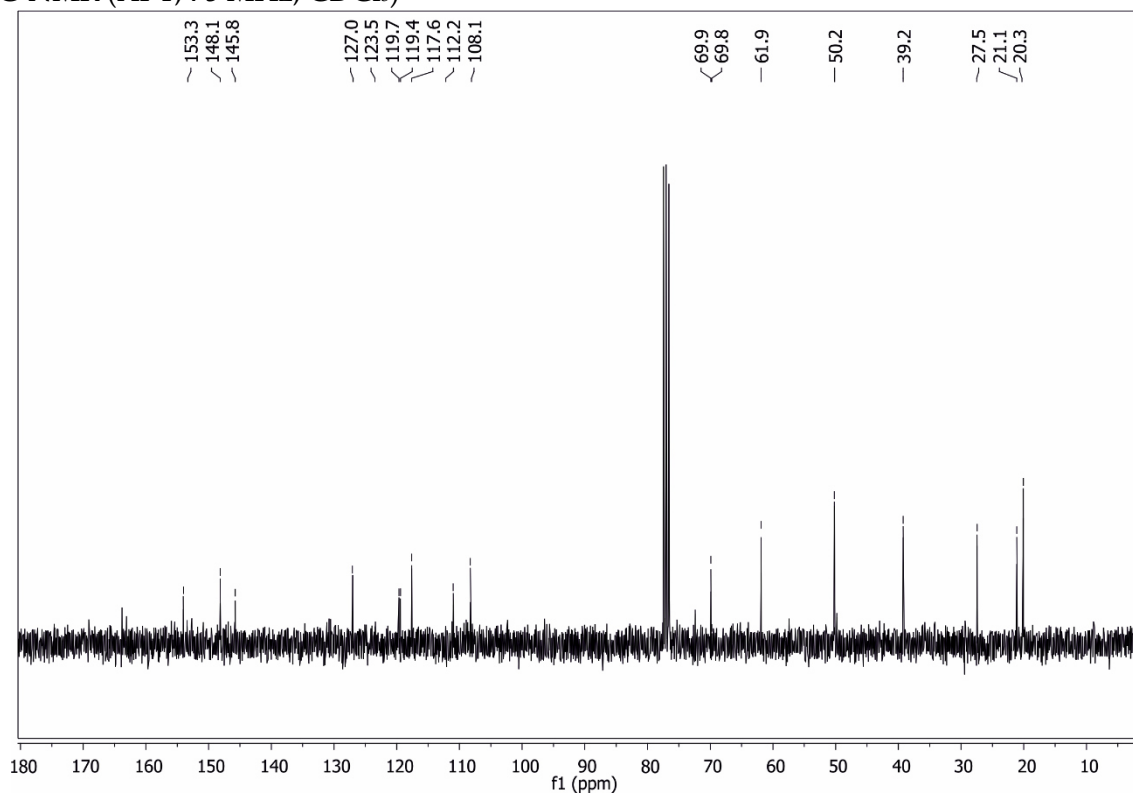
### 9.3 NMR-Spektren von Bausteinen für die Festphasensynthese

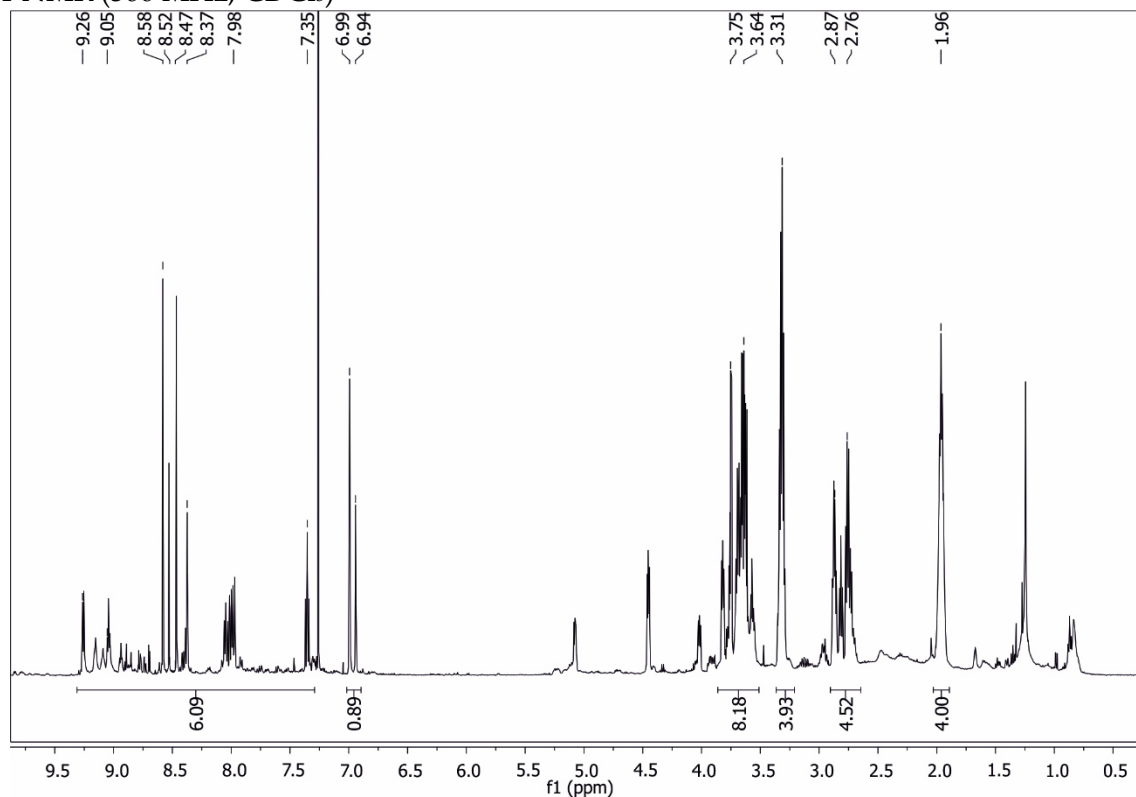
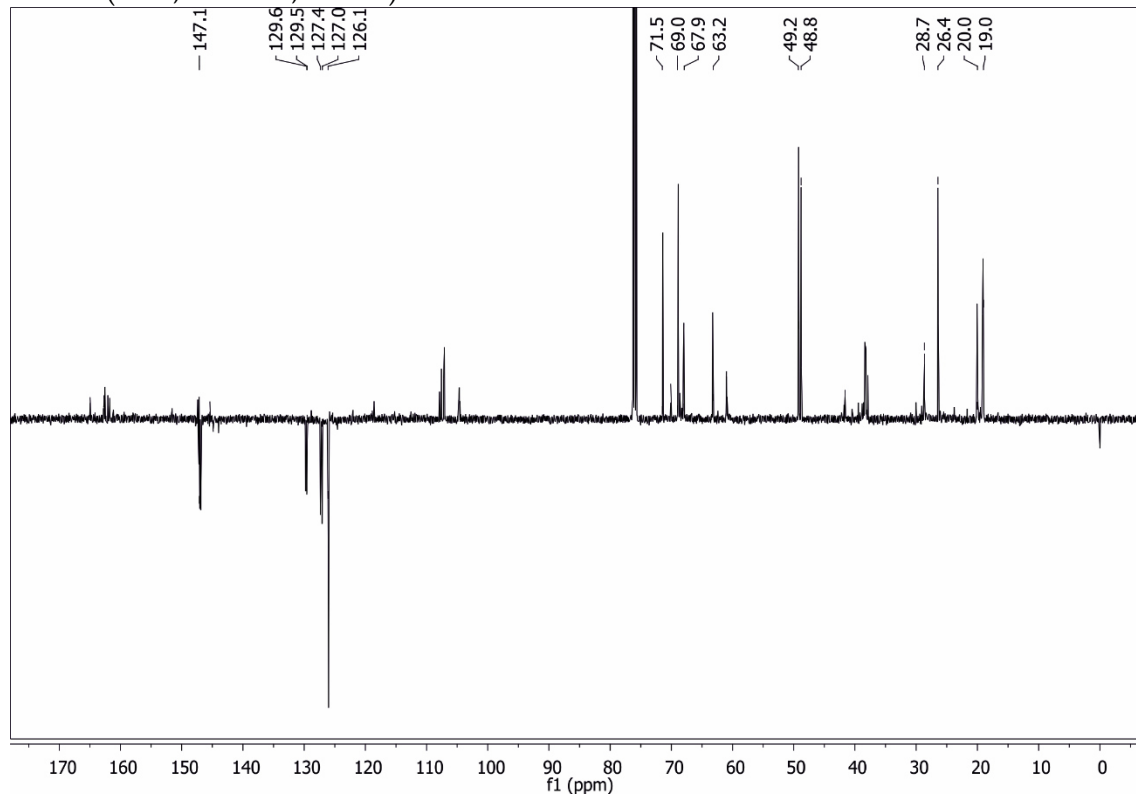
#### *N*-(2-Ethoxyethanol)-11-oxo-2,3,4,6,7,8-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin-10-amid (12)

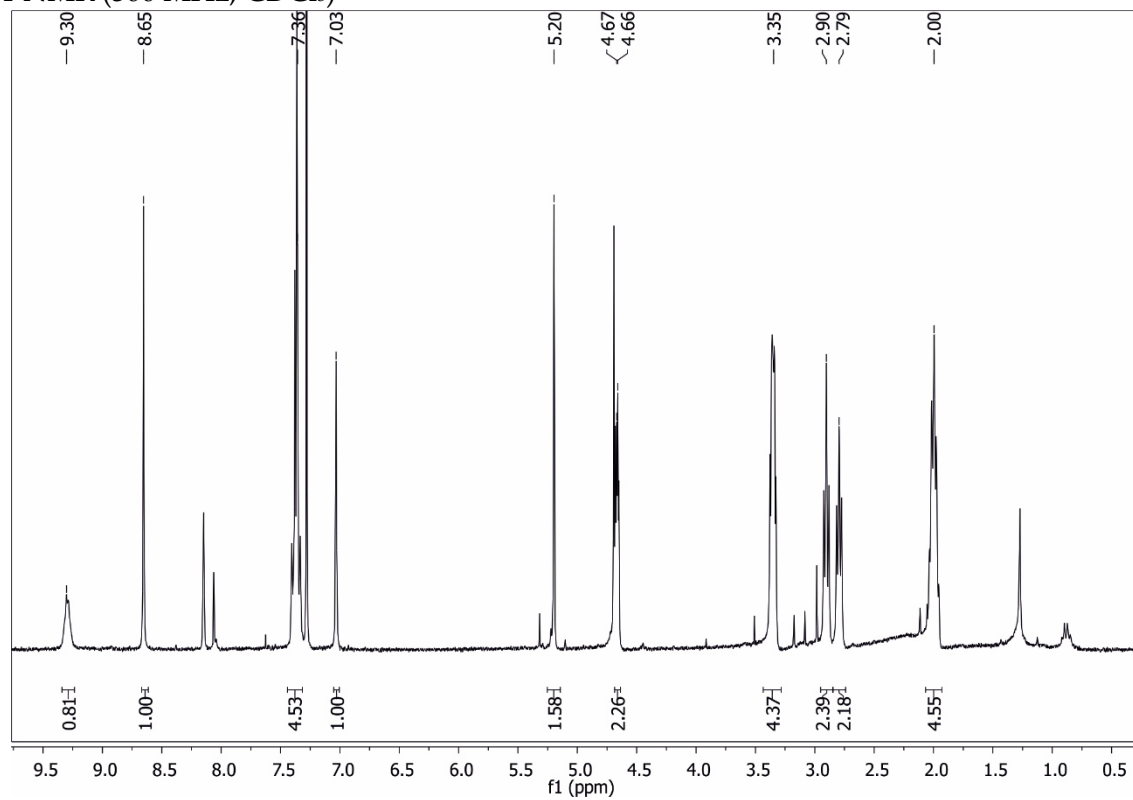
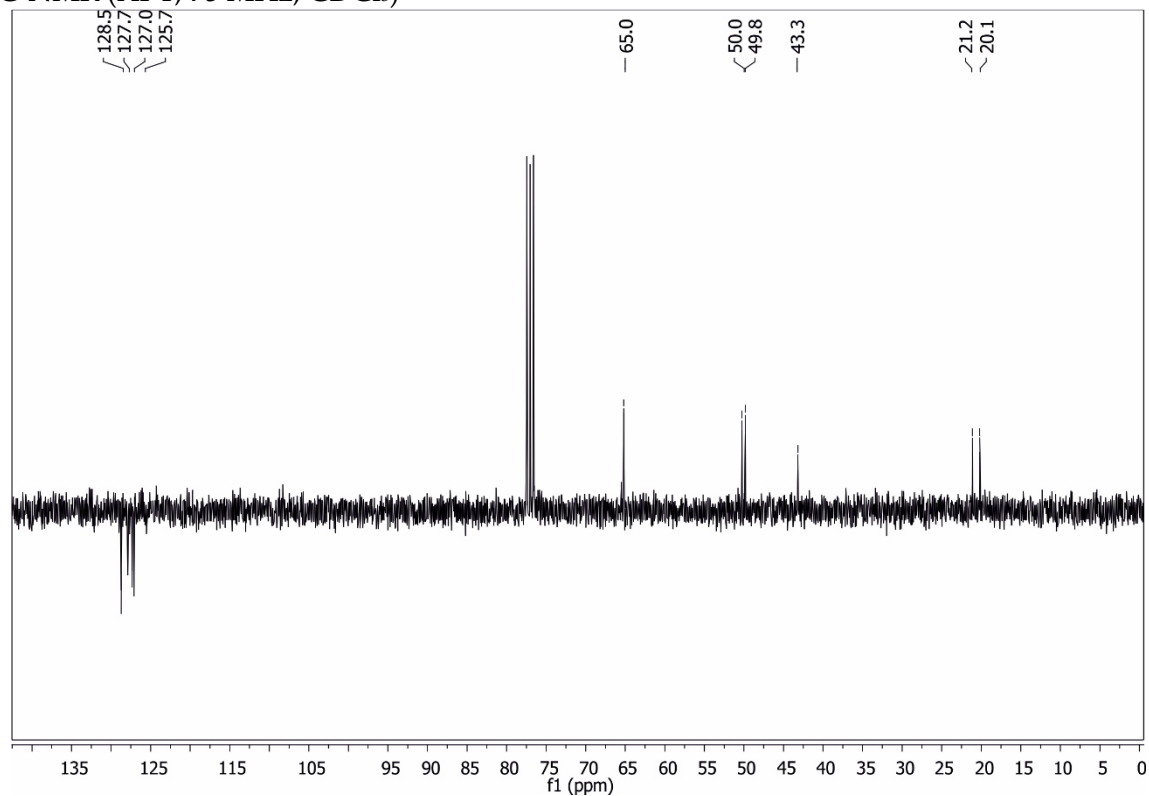
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



$^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**2-(11-Oxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin-10-amido)ethoxyethyl-3-benzoylsulfonsäureester (13)**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

***N*-(3-(Hydroxymethyl)benzyl)-11-oxo-1,2,3,5,6,7-hexahydro-chromen[6,7,8-ij]chinolizin-10-amid (28)**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## 9.4 Lebendzelleexperimente

Die hier dokumentierten Versuche wurden von **M. Sc. Jonathan Lotze** im Rahmen seiner Promotion an der Universität Leipzig unter Betreuung von Prof. Annette Beck-Sickinger durchgeführt.

### Plasmidkonstruktion

Die cDNA von hY<sub>1</sub>R, hY<sub>2</sub>R, hY<sub>4</sub>R, hNPFF<sub>1</sub>R, hNPFF<sub>2</sub>R und hD<sub>1</sub>R wurde C-terminal fusioniert mit der cDNA des gelben fluoreszierenden Proteins (eYFP) und in den eukaryotischen Expressionsvektor pVito2-hygro-mcs (InvivoGen Europe, Toulouse, France) geklont wie zuvor beschrieben.<sup>[132]</sup> Die Fusion der Cys-E3-Erkennungssequenz durch overlap-extension-PCR erreicht mit PCRBIOHifi-Polymerase (PCRBIO SYSTEMS, London, Großbritannien). Der Vorwärtsprimer wurde mit einer *Mlu*I-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und das genetisch codierte Cys-E3-Tag mit einem kurzen GG-Abstandshalter designt. Das 3'-Ende enthielt eine 16-18 Basenpaare lange Überlappungssequenz dem N-terminalen Ende des Rezeptors. Für die Rezeptoren hY<sub>2</sub>R, hY<sub>4</sub>R, hY<sub>5</sub>R und hNPFF<sub>1</sub>R überlappte das 3'-Ende mit der genetisch codierten Sequenz für das Hämagglutinin-Tag (YPYDVPDYA abgeleitet vom Influenza Virus Hämagglutinin-Protein), welches ebenfalls am das N-terminale Ende des Rezeptors fusioniert war.

#### Cys-E3\_hY<sub>1</sub>R:

5' -AAACCACGCGTACCATGTGCGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGAGATCGCCGCCCTGGAGAAG  
GAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGGCGGCAATTCAACATTATTTTCCC-3' ;

#### Cys-E3\_Hämagglutinin für hY<sub>2</sub>R, hY<sub>4</sub>R, hY<sub>5</sub>R und hNPFF<sub>1</sub>R:

5' -AAACCACGCGTACCATGTGCGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGAGATCGCCGCCCTGGAGAAG  
GAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGGCGGCTACCCATACGACGTGCC-3' ;

#### Cys-E3\_hNPFF<sub>2</sub>R:

5' -AAACCACGCGTACCATGTGCGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGG  
AGATCGCCGCCCTGGAGAAGGGCGGCAATGAGAAATGGGACAC-3' ;

#### Cys-hD<sub>1</sub>R:

5' AAACCACGCGTACCATGTGCGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGAGATCGCCGCCCTGGAGAAGGA  
GATCGCCGCCCTGGAGAAGGGCGGCAGGACTCTGAACACCTC-3' ;

pVidro\_2\_rückwärts:

5' -GCGTGGAGCCAAACG-3' .

Der Rückwärtsprimer überlappte mit dem pVidro2-hygro-mcs-Vektor nach dem Stoppcodon für die eYFP-Sequenz. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch *MluI* und *Bsp1407I* geschnitten und in den ebenso geschnittenen pVidro2-hygro-mcs-Vektor eingefügt. Die Deletion des eYFP für die Cys-E3-tragenden hY<sub>1</sub>R, hY<sub>2</sub>R, hY<sub>4</sub>R, hY<sub>5</sub>R und hNPFF<sub>2</sub>R wurde erreicht durch overlap-extension PCR. Der Vorwärtsprimer überlappte mit dem pVidro2-hygro-mcs-Vektor vor der bereits eingeführten *MluI*-Restriktionsschnittstelle und der Rückwärtsprimer enthielt eine 18 Basenpaare lange Sequenz des C-Terminus des entsprechenden Rezeptors gefolgt von einem Stoppcodon und einer *BSP1407I*-Restriktionsschnittstelle. Nach der Verdauung der PCR-Produkte durch *MluI* und *Bsp1407I*, wurden sie in den ebenso geschnittenen pVidro2-hygro-mcs-Vektor eingefügt.

Das N-terminale Cystein des zuvor geklonten Cys-E3-HA-hY<sub>2</sub>R-eYFP-pVidro2-hygro-mcs wurde zu einem Alanin mutiert durch die Verwendung der QuikChange™ ortsgerichteten Mutagenese-Methode (*Stratagene*, LaJolla, USA). Die folgenden Primer wurden verwendet:

Y2\_C2A\_vorwärts:

5' -CCACGCGTACCATGGCCGAGATCGCCGCCC-3' ;

Y2\_C2A\_rückwärts:

5' -GGGCGGCGATCTCGGCCATGGTACGCGTGG-3' .

Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

### **Zellkultur und Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie**

Zellkulturmaterialien wurden von LONZA (Basel, Schweiz) bezogen bis auf das fetale Kälberserum (FCS), welches von *Biochrom* (Berlin, Deutschland) gekauft wurde. Die Zellen wurden als Monoschicht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit gezüchtet.

*Zellen für die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie-Studien:* HEK293-Zellen (menschliche embryonische Nierenzellen) wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert mit 4.5 g/L Glucose und HAMsF12 mit L-Glutamin (1:1 v/v), angereichert mit 15 % (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS. HEK293-Zellen wurden in 8-Well  $\mu$ -Slides (ibid GmbH,

Martinsried, Germany) gesät, welche zuvor mit Poly-D-lysin (0.01 % w/v in PBS) beschichtet wurden, und über Nacht bis zu 70% der maximalen Zelldichte wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen transient transfiziert mit der entsprechenden Plasmid-DNA und *Lipofectamin*<sup>TM</sup> 2000 (*Invitrogen*, Karlsruhe, Germany) nach den Empfehlungen des Herstellers. Für einfache Transfektionen wurden 800 ng Rezeptor DNA mit 1 µl *Lipofectamin*<sup>TM</sup> 2000 pro Well verwendet.

*Zellen für IP-Akkunulationsassays:* COS-7-Zellen (afrikanische grüne Meerkatzen) wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert mit 4.5 g/L Glucose und angereichert mit 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertem FCS. COS-7-Zellen wurden über Nacht in 48-Wellplatten bis zu 70% der maximalen Zelldichte wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen transient transfiziert mit 320 ng Rezeptor-DNA, 80 ng *GαΔqi4myr-pcDNA3* und 0.8 µl *Metafecten Pro* (*Biontex Laboratories GmbH*, München, Deutschland) pro Well in DMEM über Nacht nach den Empfehlungen des Herstellers.

### Markierungsprotokolle

**(A)** Die Zellen wurden mit 5%(w/v) BSA in HBSS-Puffer (pH 7) über 5 min gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 100 nM des entsprechenden TAMRA-K3-Konjugats (**44** bzw. **95**) in HBSS (pH 7.2) mit 1%(w/v) BSA über 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS (pH 7) gewaschen und unter dem Mikroskop analysiert. Die markierten Zellen wurden dann mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 9) über 3 min bei Raumtemperatur behandelt. Der Überstand wurde mit HBSS ausgetauscht und die Zellen erneut unter dem Mikroskop analysiert.

**(B)** Die Zellen wurden mit 5%(w/v) BSA in HBSS-Puffer (pH 7) gewaschen und anschließend mit 0.5 mM TCEP in 20 mM HEPES/HBSS-Puffer (pH 7) über 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung wurde erreicht durch Behandlung der Zellen mit 100 nM TAMRA-K3-Konjugat (**44**) in HBSS (pH 7) mit 1%(w/v) BSA über 2 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS (pH 7) gewaschen und unter dem Mikroskop analysiert.

**(C)** Die Zellen wurden mit 20 mM HEPES/HBSS-Puffer (pH 7) gewaschen. Disulfid-Reduktion und Fluoreszenzmarkierung wurden erreicht durch Behandlung der Zellen mit

100 nM des entsprechenden K3-Thioester-Konjugats (**44** bzw. **70**) P in 20 mM HEPES/HBSS-Puffer (pH 7) über 5 min bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschriff mit 150 mM NaHCO<sub>3</sub> in HBSS-Puffer (pH 8.6) über 1.5 min wurde die Lösung mit 20 mM HEPES/HBSS (pH 7) ausgetauscht und die Zellen unter dem Mikroskop analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (*Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Germany) angefärbt vor dem Markierungsprotokoll.

### Fluoreszenzaufnahmen:

Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem *Zeiss* AxioObserver.Z1-Mikroskop mit einem *ApoTome* Imaging System und einem *C-Apochromat* 63x/1.20 W-Objektiv aufgenommen. Verwendet wurden folgende Filter: eYFP-Filter (Anregung: 488-512 nm; Emission: 520-550 nm), TAMRA-Filter (Anregung: 550-580 nm; Emission: 590-650 nm) and DAPI-Filter (Anregung: 335-383 nm; Emission: 420-470 nm). Die Aufnahmen wurden mit der *Zeiss* ZEN2012 Software verarbeitet.

### Studien zur Funktionalität der Fusionsproteine

Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden in 48-Well-Plattem radioaktiv markiert und stimuliert nach bekannten Protokollen.<sup>[133]</sup> Nach Inkubation über Nacht wurde die Transfektion gestoppt durch den Austausch des Mediums mit DMEM, das mit 4.5 g/L Glucose und 10%(v/v) FCS angereichert ist, und die Zellen über 6-8 h weiter kultiviert. COS-7-Zellen wurden radioaktiv markiert mit 2 µCi/ml myo-[2-<sup>3</sup>H]-Inositol (*Perkin-Elmer*, Waltham, USA) in Kulturmedium über mindestens 16 h. Für die Cys-E3-tragenden Rezeptoren wurde die Fluoreszenzmarkierung mit ATTO488-K3-Konjugat (**70**) durchgeführt wie für die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie beschrieben (Protokoll C). Als Kontrolle wurden ein Cys-E3-tragender und ein unmodifizierter Rezeptor nach dem gleichen Protokoll markiert ohne das ATTO488-K3-Konjugat. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einer Konzentration von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-6</sup> M (mit 9 Datenpunkten dazwischen) an pNPY stimuliert über 1 h bei 37 °C. Radioaktive Phosphoinositide wurden isoliert und mittels Szintillationszähler quantifiziert wie bei Hofmann *et al.* und Findeisen *et al.* beschrieben.<sup>[133]</sup> Konzentrations-Wirkungs-Kurven und EC<sub>50</sub>- sowie pEC<sub>50</sub>-Werte wurden durch nicht-lineare Regression bestimmt mittels GraphPad Prism 5.0 Software. Die Assays wurden als Duplikate in jeweils zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.





# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Seitz für das spannende Promotions-thema sowie die fortwährende Unterstützung und konstruktiven Anregungen bedanken. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger und ihrer Gruppe. Die Zusammen-arbeit und der stete Austausch mit Jonathan Lotze, Sarah Zernia und Karin Mörl waren ein sehr wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

Dem Fonds der chemischen Industrie und der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung in Form von Promotionsstipendien.

Bei den Erstkorrektoren des Manuskripts Katharina Gröger und Christian Richter möchte ich mich für ihre Anregungen und die hilfreiche Diskussion bedanken. Darüber hinaus war die Zusammenarbeit mit Christian Richter am *Alkyltransfer mit Sulfonatlinkern* eine große Hilfe für meine Arbeit. Der gesamten Arbeitsgruppe Seitz möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit auch außerhalb des Labors danken. Ganz besonderer Dank gilt dabei meinen Laborkollegen, Robert Zitterbart, Henrik Petszulat, Olalla Vázquez und Jasmine Chamiolo – die Zeit mit euch hätte besser kaum sein können.

Weiterhin möchte ich dem Schwerpunktprogramm 1623 der DFG und seinen Initiatoren für die Förderung des Projekts und meines Forschungsvorhabens danken. Der rege Austausch mit den Doktoranden und anderen Wissenschaftlern des SPP war für mich eine große Inspiration und Bereicherung.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern möchte ich für ihre ununterbrochene Unterstützung danken.





# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Ulrike Reinhardt, die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

---

Datum, Unterschrift

